

Molekuláris markerek vizsgálata differenciált pajzsmirigyrákokban

Doktori értekezés

Dr. Tóbiás Bálint Péter

Semmelweis Egyetem
Gyógyszertudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Lakatos Péter D.Sc., egyetemi tanár

Hivatalos bírálók: Dr. Hosszúfalusi Nóra Ph.D., egyetemi docens
Dr. Kovács Gábor László Ph.D., főorvos

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Szökő Éva D.Sc., egyetemi tanár
Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Antal István Ph.D., egyetemi docens
Dr. Donáth Judit Ph.D., főorvos

Budapest
2014

Tartalomjegyzék

Rövidítések jegyzéke	4
1. Bevezetés.....	6
1.1. A pajzsmirigyről általában	6
1.2. A pajzsmirigy vizsgálata	7
1.3. A pajzsmirigy megbetegedései	10
1.4. A pajzsmirigy daganatos megbetegedései	11
1.5. Papillaris carcinoma	15
1.6. Follicularis carcinoma.....	16
1.7. A D-vitamin és a pajzsmirigy kapcsolata	17
1.8. Lehetséges új molekuláris célpontok a pajzsmirigydaganatok kialakulásának háttérében.....	19
1.8.1. BRAF gén.....	21
1.8.2. RAS géncsalád – NRAS, HRAS és KRAS gének.....	22
1.8.3. RET/PTC génátrendeződések	23
1.8.4. PAX8/PPAR-gamma génátrendeződések	24
1.8.5. A „3 gén modell”: SFN, HMGA2, MRC2.....	24
1.8.6. CYP24A1 és CYP27B1 gén expresszió.....	25
2. Célkitűzés	27
3. Módszerek	28
3.1. Minták gyűjtése.....	28
3.2. Nukleinsav (DNS, RNS) izolálás	28
3.3. Szomatikus onkogén mutációk vizsgálata melting curve analízis segítségével	29
3.4. Szomatikus onkogén génátrendeződések vizsgálata real-time-PCR készülékkel	

3.5. A „3 gén modell” expressziós mintázatának vizsgálata valós idejű, real-time-PCR készülékkel	32
3.6. CYP24A1 és CYP27B1 gének expressziójának vizsgálata real-time-PCR-rel.	32
3.7. Immunhisztokémia.....	33
3.8. Statisztikai analízisek.....	34
4. Eredmények.....	36
4.1. Szomatikus onkogén BRAF mutáció vizsgálata hazai differenciált pajzsmirigy tumor mintákon	36
4.2. Szomatikus onkogén RAS géncsalád (NRAS, HRAS, KRAS) mutációinak vizsgálata hazai differenciált pajzsmirigy tumor mintákon	37
4.3. Szomatikus onkogén RET/PTC génátrendeződés vizsgálata hazai differenciált pajzsmirigy tumor mintákon	38
4.4. Szomatikus onkogén PAX/PPARgamma génátrendeződés vizsgálata hazai differenciált pajzsmirigy tumor mintákon	39
4.5. Az SFN, MRC2, HMGA2 gének expressziós mintázatának vizsgálata hazai papillaris pajzsmirigy tumor mintákon	39
4.6. A CYP24A1 és CYP27B1 gén expressziójának vizsgálata papillaris pajzsmirigy tumor mintákon	43
4.7. A SFN, MRC2, HMGA2 génexpresszió és CYP2A1 génexpresszió összehasonlítása hazai papillaris pajzsmirigy tumor mintákon	51
5. Megbeszélés	55
5.1. Szomatikus onkogén BRAF mutáció vizsgálata hazai differenciált pajzsmirigy tumor mintákon	57
5.2. Szomatikus onkogén RAS géncsalád (NRAS, HRAS, KRAS) mutációinak vizsgálata hazai differenciált pajzsmirigy tumor mintákon	58
5.3. Szomatikus onkogén RET/PTC génátrendeződések vizsgálata hazai differenciált pajzsmirigy tumor mintákon	58

5.4. Szomatikus onkogén PAX8/PPARgamma géátrendeződések vizsgálata hazai differenciált pajzsmirigy tumor mintákon	58
5.5. A SFN, MRC2, HMGA2 génexpresszió összehasonlítása hazai papillaris pajzsmirigy tumor mintákon	59
5.6. A CYP24A1 és CYP27B1 gén expressziójának vizsgálata papillaris pajzsmirigy tumor mintákon	59
5.7. A SFN, MRC2, HMGA2 génexpresszió és CYP2A1 génexpresszió összehasonlítása hazai papillaris pajzsmirigy tumor mintákon	61
6. Következtetések.....	64
7. Összefoglalás	66
8. Irodalomjegyzék.....	68
9. Saját publikációk jegyzéke	76
10. Köszönetnyilvánítás	78
11. Mellékletek	80

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

– cc.	carcinoma
– CCDC6	coiled-coil domain containing 6
– DNS	dezoxiribonukleinsav
– EGF	epidermális növekedési faktor (epidermal growth factor)
– EGFR	epidermális növekedési faktor receptor (epidermal growth factor receptor)
– ELISA	enzimhez kapcsolt immunszorbens vizsgálat (enzyme-linked immunosorbent assay)
– ERK	extracelluláris jel hatására aktivált kináz (extracellular-signal-regulated kinase)
– FGF	fibrolaszt növekedési faktor (fibroblast growth factor)
– FIA	fluoreszcens alapú immunszorbens vizsgálat
– FNAB	vékonytű-biopszia (fine needle aspiration biopsy)
– FTC	follicularis pajzsmirigy carcinoma (follicular thyroid cancer)
– FVPTC	papillaris papillaris carcinoma follicularis variánsa
– GAPDH	gliceraldehyd 3-foszfát dehidrogenáz
– GDP	guanozin-difoszfát
– GTP	guanozin-trifoszfát
– H4	histon 4 fehérje
– HMGA2	high-mobility group AT-hook 2
– HRAS	Harvey rat sarcoma viral oncogene homolog
– KRAS	Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog
– LIA	lumineszcens alapú immunszorbens vizsgálat
– MAPK	mitogénaktivált protein-kináz
– MCPTC	papillaris pajzsmirigy microcarcinoma
– MRC2	mannose receptor, C type 2
– NCOA4	nuclear receptor coactivator 4
– NGS	next generation sequencing
– NRAS	neuroblastoma RAS viral (v-ras) oncogene homolog
– RIA	radioimmunassay

- PAX 8 paired box 8
- PBS foszfáttal puffertelt sóoldat (phosphate-buffered saline)
- PKAR1A cAMP-dependent protein kinase type I-alpha regulatory chain
- PPAR peroxisome proliferator-activated receptor
- PTC papillaris pajzsmirigy carcinoma (papillary thyroid cancer)
- RAS rat sarcoma
- RET RET (rearranged during transfection) protoonkogén
- RET/PTC rearranged during transfection/ papillary thyroid cancer
- RNS ribonukleinsav
- SFN stratifin
- SLC5A5 sodium/iodide cotransporter member 5
- SNP egy pontos nukleotid polimorfizmus (single nucleotid polimorfism)
- TIRADS thyroid image reporting and data system
- TPO pajzsmirigy peroxidáz (thyroid peroxidase)
- TSH thyreotrop hormon
- TRH thyreotropinfelszabadító hormon
- T3 trijód-tironin
- T4 tiroxin

1. BEVEZETÉS

A pajzsmirigy az emberi szervezetben nélkülözhetetlen szerepet tölt be. Hatására az adott pillanatnak megfelelően gyorsulnak vagy lassulnak különböző szellemi és fizikai folyamataink. Ha valamilyen okból ez az egyensúly megbomlik, akkor beszélünk betegségről. Hazánkban a pajzsmirigy problémák népbetegségnek számítanak. A magyar emberek pajzsmirigye már gyermekkorban nagyobb, mint a megfelelő jódeleveltségű országokban élő hasonló korosztályúaknak. A megfigyelések alapján mondhatjuk, hogy a nők körében sokkal gyakoribb az e mirigyet érintő megbetegedés, mint a férfiak esetében [1].

Az összes mirigyes szervünkkel kapcsolatban írtak már le valamilyen daganatos megbetegedést. Az utóbbi években a pajzsmirigy került górcső alá, ami részben a molekuláris biológia egyre növekvő térnyerésének is köszönhető. A teljes humán genom megszekvenálása óta jelentősen átalakult a tudományos világ és jelentős szemléletváltás következett be. Az új technológiák (NGS, next generation sequencing) révén az információáramlás felgyorsult, a költséghányadok jelentősen lecsökkentek és a kutatókon kívül már a mindennapok emberéhez is közelebb került a genetika [2]. Korábban a genetikai kutatások, diagnosztikák középpontjában álló egy pontos nukleotid polimorfizmusok (SNP) vizsgálatát mára felváltotta a robosztus génmutációs panelek vizsgálata.

1.1. A pajzsmirigyről általában

A pajzsmirigy (glandula thyreoidea) a nyak elülső részén, a nyelőcső előtt elhelyezkedő, pillangó alakú mirigy. Anatómiáját tekintve tojás alakú, 10-20 gramm tömegű mirigy, amelyet két lebenyre és egy hídra, isthmusra oszthatjuk. Fiziológiai szempontból a belső elválasztású mirigyek csoportjába tartozik és szerepet játszik a szervezet anyagcsere-folyamatainak, a sejtek génexpressziójának szabályozásában. A pajzsmirigy hormonális szabályozása negatív feedback révén a hypothalamus-hypophysis rendszer irányítása alatt áll. A hypothalamusban termelődő 3 aminosavból álló thyreotropinfelszabadító hormon (TRH) hatására az adenohypophysis thyreotrop sejtjeiben képződő thyreotrop hormon (TSH) szabályozza közvetlenül a pajzsmirigy működését. A TRH a TSH szekrécióján kívül a TSH génnek az átíródását is fokozza. A TSH másik jelentős szabályozója a perifériás vér T3/T4 szintje, amelyek

szérumkoncentrációjának növekedése negatív visszacsatolással csökkenti a hypothalamus TRH szintézisét, valamint a TSH gén transzkripcióját. A TSH szint sajátos napi ritmussal rendelkezik, ugyanis napközben alacsony, majd éjszaka éri el csúcskoncentrációját és reggelre visszacsökken [1, 3].

1.2. A pajzsmirigy vizsgálata

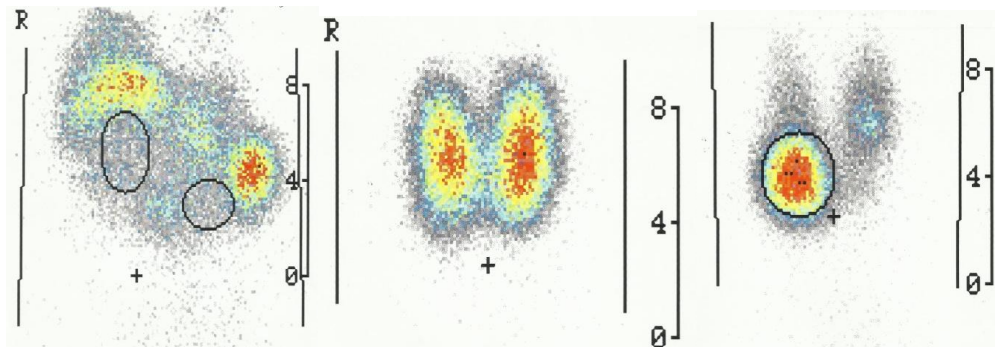
Az orvostudomány fejlődésével a vizsgáló módszereknek is lépést kellett tartaniuk. A hosszú éveken át – többek között ma is – alkalmazott tapintásos vizsgálódás terjedt el leginkább. A módszer lényege, hogy a beteg mögött elhelyezkedve két kéz mutató- és középső ujjával keresik a mirigyállományt, ill. a tájékozódásban segítséget nyújtó gyűrűporcot. A másik lehetőség, hogy szemből, a hüvelykujjal tapintják ki a szervet. Ez a módszer lehetőséget ad egy gyors felmérésre a mirigy állományával (konzisztencia, van-e benne göb, milyen eltérést mutat nyelés hatására), valamint a környékbeli nyirokcsomókkal kapcsolatban.

Mindezek mellett ma már egy szélesebb körben állnak rendelkezésünkre lehetőségek, amelyeket célszerű négy nagy csoportra bontani: in vitro, in vivo, képalkotó eljárás és tübiopszia.

Az in vitro vizsgálatok a sorába a rutin laboratóriumi tesztek soroljuk, amelyekkel a lehető legegyszerűbb a pajzsmirigy pillanatnyi állapotát felmérni. Ide tartozik a TSH meghatározása, amely igen hosszú utat járt be a hetvenes években megjelent első radioimmunassay (RIA) óta. Mindeközben finomodott a módszer is, ezáltal az érzékenysége is úgy változott, hogy az euthyreosis és a hyperthyreosis közt biztonsággal tesz különbséget, amely az első generációs tesztekkel még nem volt megvalósítható. A módszer lényege az ún. szendvicstechnika, az első antitest többnyire a TSH béta-alegységéhez kötődő monoklonális antitest, amely szilárd fázishoz kötött és fixálja a vizsgálandó anyagban a TSH-t, míg a második antitest a módszertől függően jelölt mono- vagy poliklonális antitest. A jelölés lehet radioaktív (RIA), enzimatis (ELISA), fluoreszcens (FIA) vagy lumineszcens (LIA). A TSH mérése mellett lényeges a szabadhormon-szintet is mérni a pontos diagnózis felállításához. Természetesen lényeges minden külső körülményt is figyelembe venni, többek között, hogy milyen gyógyszereket szed a beteg, mivel azoknak lehet TSH növelő vagy épp csökkentő hatása, ezáltal hamis eredményeket kaphatunk. A teljesség igénye nélkül az ösztrogén,

antiepileptikumok, vízhajtók növelhetik, a dopamin, a heparin és a szalicilátok pedig csökkenthetik a TSH szérumszintjét.

Az in vivo vizsgálatok során per os vagy parenterálisan juttatunk radioaktív izotópot a betegbe, ezáltal kaphatunk információt a pajzsmirigy struktúrájáról. Az alkalmazható izotópok széles tárháza áll rendelkezésünkre. A technécium-99m (^{99m}Tc) mesterséges izotóp, amely a jodidhoz hasonlóan jut a pajzsmirigybe és ott nem metabolizálódik, raktározódik, hanem relatív gyorsan kiürül (felezési ideje 6 óra), az okozott sugárterhelés minimális. A jód-131 (^{131}I) izotópot már ritkábban használják többek között hosszú felezési ideje (8 nap) miatt. Az ún. szcintigráfias vizsgálatok során a göbök funkciójáról kapunk információt. Aszerint, hogy egy göb a normál szövethez képest milyen mértékben vesz fel izotópot különböztetünk meg fokozott felvételű („forró”) és csökkent felvételű („hideg”), valamint átmenetit („intermedier”), azaz a normál pajzsmirigy szövettel egyenértékűt (1.ábra). A forró göbök igen ritkán malignusak, ezzel szemben a hideg göbök adják csaknem az összes malignus elváltozást.



1. ábra Pajzsmirigy szcintigráfia során kapott kép
(hideg göb, normál pajzsmirigy és meleg göb)

A képképző eljárások segítségével lehetőség van a tapintással nem érzékelhető vagy épp a szcintigráfia során hidegnek jelzett göbök vizsgálatára. Az ultrahangos vizsgálat mára nélkülözhetetlenek lett a mindennapi rutin során. Ez annak köszönhető, hogy a pajzsmirigy kisméretű és felszínesen helyezkedik el, így könnyen kaphatunk nagyfelbontású képeket, ezáltal a 2 mm-es cysták és 3 mm-es solid képletek is elkülöníthetőek. A radiológusok az emlőbiopsziák osztályozásához hasonlóan a pajzsmirigyre is kifejlesztettek egy egységes rendszert, amely segítségével ultrahangos vizsgálat során könnyen kategorizálható a látott kép és a kérdéses göb státusza. Ez a

rendszer, a Thyroid image reporting and data system (TIRADS), amely alapján 6 csoportba lehet sorolni a vizsgált göböt [4-7]. (1. táblázat)

TIRADS kategória	jellemzők
1	normál pajzsmirigy
2	benignus laesio
3	valószínűsíthetően benignus laesio (5%-nál kisebb a malignitás esélye)
4	malignitásra gyanús laesio
5	valószínűen malignus laesio (80%-nál nagyobb az esélye)
6	biopsziával bizonyított malignitás

1. táblázat A TIRADS (Thyroid image reporting and data system) rendszer, amely segítségével a radiológus könnyebben kategorizálhatja a vizsgált pajzsmirigy göböket [4-6].

Több előnye van ennek a vizsgálatnak: olcsó, más módszerrel nem kaphatunk ilyen jól értékelhető képet, biztonságos, nincs szövethárosodás a vizsgálat során. Az ultrahangos vizsgálat a diagnózis pontos felállításában megkerülhetetlen vizsgálat. Segít a célzott vékonytű-aspirációs citológiai vizsgálat (fine needle aspiration biopsy, FNAB) precíziós végrehajtásában, információt ad a göb, ill. környezete vascularizáltságáról, patológiás nyirokcsomók jelenlétéről. A legtöbb tumoros göb echoszegény, nem éles kontúrú, hypervascularizált, lehet benne vérzés, cysta, necrosis vagy meszesedés. Az ultrahang vezérelt vékonytű-biopsziának jelentős és kiemelt szerepe lett a göbök műtét előtti malignitásbecslésére, azaz a göbök differenciáldiagnosztikájára, és e mellett a thyreoiditisek igazolására is alkalmas. A módszer eredményességét tükrözi, hogy fals pozitív és fals negatív eredmények kis mértékben fordulnak elő, ezáltal a feleslegesen elvégzett műtétek száma csökkenthető. A vizsgálat elterjedése előtt a sebészileg eltávolított pajzsmirigy göbök mindössze 10-20%-a bizonyult valóban daganatos elváltozásnak. Ha a biopsziát tapasztalt orvos megfelelően végzi, akkor a felesleges műtétek aránya töredékére csökkenthető, és a daganatot igazoló citológiai vizsgálatok 90-95%-ában a szövettan is igazolja a tumoros folyamat jelenlétét. A biopszia ismétlésére általában 5-10%-os gyakorisággal kerül sor, a minta véressége vagy

sejtszegénysége miatt. A gyanús göbök mellett a nyirokcsomók ellenőrzésére is használható ez a minimális beavatkozást igénylő vizsgálat.

A fent leírt citológiai eljárás vált a pajzsmirigy vizsgálatok „gold standard”-jévé. A nagyon jó hatásfokú vizsgálat még tovább fejleszthető. Ehhez a XX-XXI. század fordulóján ugrásszerűen fejlődő molekuláris biológiát kell segítségül hívni, hogy egy kombinált, még specifikusabb diagnosztikai módszer épüljön be a rutin diagnosztikába. A genetikai kutatások révén olyan szomatikus onkogén génmutációk és génátrendeződések kerültek a figyelem középpontjába, amelyek alapján prediktálható a kérdéses göb státusza, valamint műtéten átesett betegek kezelési stratégiája határozható meg.

1.3. A pajzsmirigy megbetegedései

A pajzsmirigy betegségeket feloszthatjuk életkor szerint, amikor elkülönítjük az újszülött és felnőtt korban megjelenő kórképeket. A csecsemők esetében bekövetkező hormonális alulműködés eredménye a kreténizmus, azaz a hossznövekedés és a szellemi fejlődés visszamaradottsága.

Felnőtt korban jelentkező tünetek két okra vezethetőek vissza: a pajzsmirigy alul- vagy túlműködésére.

A megnövekedett hormontermelés hatására a szervezet energiaszféráinak felgyorsulnak, amit jelentős hőtermelés (melegintolerancia) követ és mindezek mellett fokozódnak bizonyos életfunkciók, a központi idegrendszer fokozottabb állapotba kerül, aminek hatására pl. tremor, idegesség és álmatlanság alakul ki. Túlnyomórészt a pajzsmirigy túlműködéséből eredően a keringésbe kerülő pajzsmirigyhormon többlet hatására biokémiai és kórélettani változások, thyreotoxicosis alakul ki. Életkortól függetlenül manifesztálódik, amit leginkább a hormonszint befolyásol.

Több alfaját különböztetjük meg: Graves-Basedow-kór, toxikus göbös strúma, jóindukálta hyperthyreosis, TSH indukálta hyperthyreosis, throphoblasttumorkok, nem pajzsmirigy eredetű thyreotoxicosisok.

A csökkent hormontermelés hatására a szervezet energiaszféráinak, bizonyos életfunkciók lelassulnak, kevésbé tolerálja a hideget, ödémák jelenhetnek meg, a nemi funkciókban zavar áll be és a szellemi működés is belassul, amit többek között a folyamatos fáradtság kísér. Ez a folyamat különböző szöveti változásokat is eredményez, többek között kialakul a strúma, amikor is megnövekszik a pajzsmirigy

szövetállománya, hogy lépést tudjon tartani a szervezet hormonigényével. Etiológiáját tekintve lehet veleszületett vagy szerzett, járhat normo-, hypo- vagy hyperfunkcióval [8]. A strúmákat is két nagy csoportra tudjuk bontani: diffúz és göbös strúma.

A diffúz strúmák csoportjába sorolható az endémiás strúma, ami Magyarországon igen gyakori, és az általános jódhányra vezethető vissza. A másik alcsoport a sporadikus strúma, amely nem a jódhánytalansággal, hanem az autoimmun, örökletes folyamatokkal vagy gyógyszer mellékhatásokkal áll összefüggésben.

A göbös strúmákban kialakuló göbök a normál állománytól eltérő tapintatú, előnyomuló képletek. Előfordulása igen gyakori, főleg jódszegény területeken (30-50% nőkben, 20-30% férfiakban). Morfológiailag ezek a göbök lehetnek tokkal körülvettek, adenomák vagy tok nélküli, adenomatosus strúma göbök. A WHO-s klasszifikáció a szcintigráfia alapján csoportosítja ezeket, így lehetnek csökkent („hideg” göb), fokozott („meleg” göb) vagy normális jódfelvételűek. Hazánkban nagyobb arányban a „hideg” göbök fordulnak elő (85%), amelyek jelentős része (5-10%) az idő előrehaladtával malignizálódik [8].

1.4. A pajzsmirigy daganatos megbetegedései

A pajzsmirigy daganatokat a XVIII-XIX. század fordulóján kezdték el részletesebben tárgyalni. Jó másfél évszázadon át az egyetlen hatékony kezelés a műtéti eltávolítás volt, majd 1946-ban kezdődött el a radiojód-kezelés, amely a mai napig is tart.

Az évente felismert új pajzsmirigy daganatok száma jelentősen megemelkedett hazai és nemzetközi viszonylatban egyaránt. Mindezek alapján túlzás nélkül állíthatjuk, hogy a leggyakoribb endokrin malignus tumorról van szó. Volt olyan ország, ahol a vizsgált periódusban megduplázódott a pajzsmirigy daganatok száma. Az USA-ban 15-20 évvel ezelőtt 15000 új esetet regisztráltak, ez 2005-re 33000-re emelkedett (forrás: Cancer Statistic, SEER Program, National Institute of Health, USA). 1973-2003 között a papillaris carcinoma incidenciája (follicularis variánst is beleértve) 189%-os emelkedést mutatott [9]. Éves szinten az újonnan diagnosztizált pajzsmirigy tumorok aránya az USA-ban körülbelül 1,0-1,5%-ra tehető az előfordulási gyakoriság alapján az összes daganatra nézve [10]. A magyarországi adatok is hasonlóan drasztikus emelkedést mutattak: 1990-es években évi 2-300 új esetre derült fény, ez 2006-ra már

az 500-at is meghaladta [11, 12]. A betegség átlagos jelentkezési ideje papillaris carcinomában a 45. életév, follicularis carcinomában pedig az 50. év. A papillaris és follicularis arányt jelentősen befolyásolja a jódeellátottság. Jódszegény vidéken a differenciált PTC és FTC aránya kisebb, míg jódban gazdag területen ez az arány magasabb. Különböző más környezeti faktorok is szerepet játszanak a daganatok kialakulásában pl. családi faktorok, irradiáció, autoimmun folyamatok. A pajzsmirigy carcinomák incidenciája 1,2-2/100.000 férfiak, 2-3,8/100.000 nők esetében. A tumorok mortalitása 0,2-1,2/100.000 férfiak, 0,4-2,8/100.000 nők esetében. A számadatokból is jól látszik, hogy a nők jobban veszélyeztetettek a megbetegedést, ill. a halálozást illetően [13].

Mindez az epidemiológiai változás valószínűsíthetően inkább az egyre kifinomultabb diagnosztikai módszereknek köszönhető, nem pedig egy, a világot egységesen behálózó szomatikus onkogén hatásnak. A mindennapos diagnosztikában jelentős szerepet kap az ultrahang vezérelt vékonytű-biopszia, valamint megjelentek olyan korszerű módszerek, kezelések, mint például a PET-CT.

A pajzsmirigy daganatok irradiáció mértékétől függő területi eloszlásának, viselkedésének, korcsoportbeli eloszlásának, frekvenciájának kiismerésében az 1986-os csernobili atomkatasztrófa utáni vizsgálatok jelentős mennyiségű információval szolgáltak.

Az utóbbi években egyre több haza és nemzetközi irányelv (pl. American Thyroid Association 2009-es útmutatása: *Revised American Thyroid Association Management Guidelines for Patients with Thyroid Nodules and Differentiated Thyroid Cancer*) épült be az orvosi gyakorlatba, amely megkönnyíti a pajzsmirigyrákok felismerését, kezelését, ill. a betegek gyógykezelését.

A pajzsmirigydaganatokat szövettani szempontok alapján két nagy csoportra bontjuk. Az egyik csoportba tartoznak a pajzsmirigyre jellemző vonásokkal bíró papillaris, follicularis és medullaris carcinomák, míg a másik csoportba az anaplasticus carcinomák tartoznak. A harmadik, ritka csoportba más szervekben is előforduló daganattípusok tartoznak, mint például a lymphomák. A pajzsmirigyre jellemző tumorok a follicularis epithelsejtekből indulnak ki vagy a parafollicularis C-sejtekből (medullaris cc.). A szöveti differenciáció fokát tekintve a papillaris és follicularis carcinomát nevezzük összefoglalóan differenciált pajzsmirigy carcinomának. A

medullaris carcinoma külön entitás a pajzsmirigy daganatok között, a differenciálatlan vagy anaplasticus carcinoma pedig az igen rosszindulatú daganatok csoportját képezik. Még léteznek egyéb epithelialis tumorok, de ezek előfordulási gyakorisága igen alacsony. Jelen dolgozatban a follicularis epithelsejtekből kiinduló, differenciált tumorok tárgyalásával foglalkozunk, amely lehet papillaris vagy follicularis rák. A papillaris daganatoknál altípusokat különböztetünk meg, amelyek közül a leggyakrabban a follicularis variáns, microcarcinoma, encapsulált, Hürthle-sejtes (vagy oncocyter) variáns, tall cell (magas sejtes) variáns fordul elő, de találkozhatunk még diffúz sclerotizáló, solid, macrofollicularis típusokkal is [14].

A gyakoriságukat tekintve a carcinomák megoszlása a következő: 65-80% papillaris, 10-15% follicularis, 5-7% medullaris, 2-5% anaplasticus és 1-2% egyéb [15-17]. A 10 mm-nél kisebb tumorokat microcarcinomáknak hívjuk. A kevert tumoroknál legalább 2 szubtípus szövettani képe keveredik egymással, pl. a papillaris carcinoma follicularis variánsánál, amelyet klinikopatológiai viselkedése alapján a papillaris carcinomák közé soroljuk). A daganatok osztályozására leginkább elterjedt rendszer, a 2002-ben megújult TNM-klasszifikáció (2. táblázat). Ez azért nagy segítség, mert tartalmazza a tumor nagyságát, kiterjedésének viszonyát a környező szövetekhez képest, a nyirokcsomók státuszát, számát és elhelyezkedését. A differenciált pajzsmirigy rákoknál a TNM alapján I-IV. stádiumot különböztetünk meg (3. táblázat).

2. táblázat A pajzsmirigy daganatok TNM rendszere

(forrás: UICC TNM atlasz 7. kiadás, 2012)

Primer tumor (T)	
TX	Primer tumor nem ítéhető meg
T0	Primer tumor nem mutatható ki
T1	2 cm vagy kisebb legnagyobb kiterjedésű, pajzsmirigyre korlátozódó daganat
T1a	1 cm vagy kisebb legnagyobb kiterjedésű, a pajzsmirigyre korlátozódó daganat
T1b	1 cm-t meghaladó, de legfeljebb 2 cm legnagyobb kiterjedésű, pajzsmirigyre korlátozódó daganat
T2	2 cm-t meghaladó, legfeljebb 4 cm legnagyobb kiterjedésű, pajzsmirigyre korlátozódó daganat
T3	4 cm-nél nagyobb kiterjedésű, pajzsmirigyre korlátozódó, vagy minimális mértékben a pajzsmirigyen túl (pl. a m. sternothyreoideusra, vagy a pajzsmirigy körüli lágy részekbe) terjedő daganat
T4a	A daganat áttörte a pajzsmirigy tokját és ráterjed a következők bármelyikére: subcutan lágyrészek, gége, légcső, nyelőcső, n. laryngeus recurrens.
T4b	A daganat a prevertebrális fasciára vagy a mediastinum ereire terjed, netán befogta az a. carotist.
<i>Minden anaplasztikus carcinomát a T4 kategóriába kell sorolni.</i>	
T4a	(kizárólag anaplasztikus carcinoma) pajzsmirigyre korlátozódó daganat (mérettől függetlenül)
T4b	(kizárólag anaplasztikus carcinoma) pajzsmirigyen túlterjedő daganat (mérettől függetlenül)
Regionális nyirokcsomók (N)	
NX	Regionális nyirokcsomó nem ítéhető meg
N0	Nincs regionális nyirokcsomóáttét
N1	Regionális nyirokcsomóáttét
N1a	VI-os szintű metastasis (pre-, paratrachealis, valamint prelaryngealis (Delphi-i) nyirokcsomókban)
N1b	Egy- vagy kétoldali, vagy ellenoldali nyaki, vagy retropharyngealis, vagy felső mediastinalis nyirokcsomók I-es, II-es, III-as, IV-es vagy V-ös szintű áttéte
Távoli áttétek (M)	
M0	Nincs
M1	Távoli áttét(ek)

Stádium-besorolás			
<i>Papillaris és follicularis carcinoma (életkor < 45 év):</i>			
Stádium	T	N	M
I	bármely T	bármely N	M0
II	bármely T	bármely N	M1
<i>Papillaris és follicularis carcinoma; differenciált (életkor ≥ 45 év):</i>			
Stádium	T	N	M
I	T1	N0	M0
II	T2	N0	M0
III	T3	N0	M0
IVA	T1-3	N1a	M0
	T4a	N1b	M0
IVB	T4b	bármely N	M0
IVC	bármely T	bármely N	M1

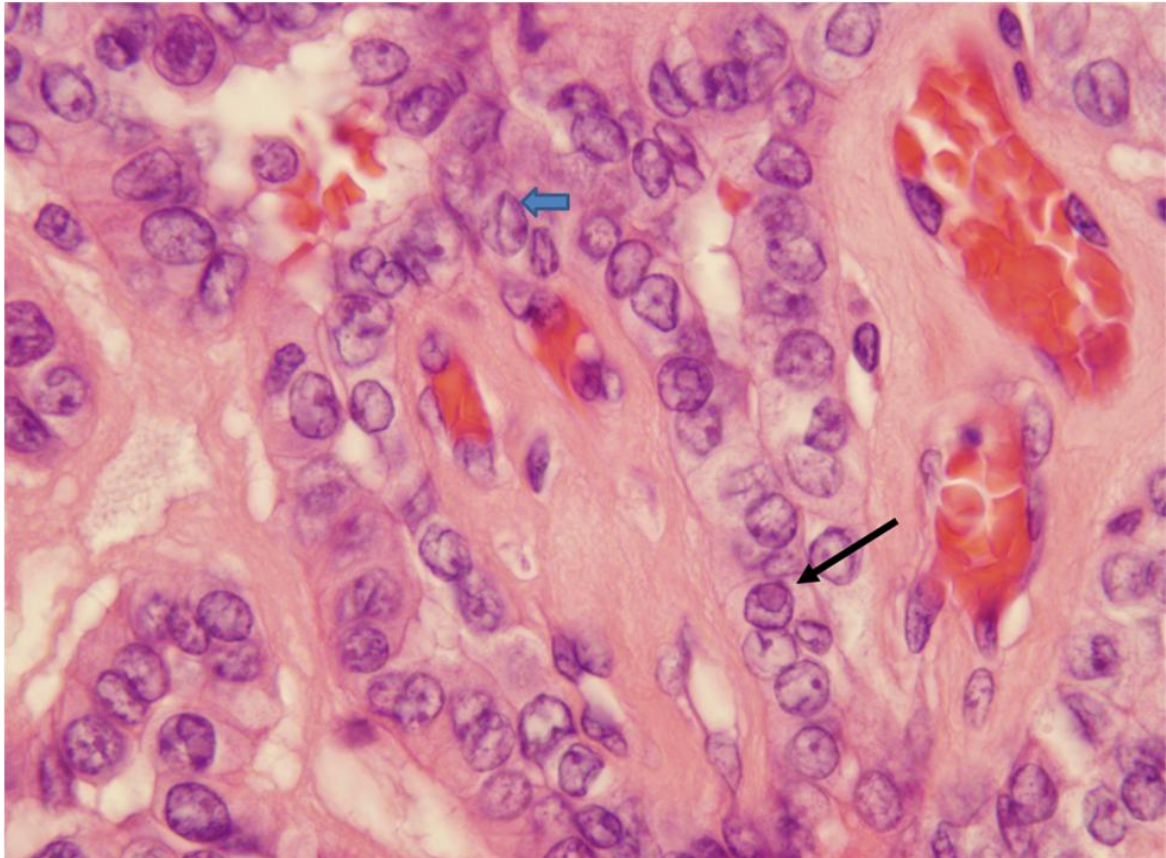
3. táblázat A papillaris és follicularis (differenciált) carcinomák külön stádium-besorolása. (forrás: UICC TNM atlasz 7. kiadás, 2012)

1.5. Papillaris carcinoma

A papillaris carcinoma a leggyakoribb pajzsmirigy daganat, az összes eset közel 80%-át adja. Karakterisztikáját tekintve igen széleskörű: a kis indolens tumoroktól egészen a nagy, gyorsan növekvő, lokálisan invazív, metastatizáló változatig bármelyik előfordulhat. A legtöbb PTC kezelését tekintve jó prognózissal rendelkeznek. Ennek valamelyest ellentmond, hogy a betegek 5,7%-ánál 5 éven belül, 9,4%-ánál 10 éven belül kiújul a tumor a környező szövetekben, vagy a pajzsmirigy ágában, illetve távoli áttéteket is képezhet a csontokban és a tüdőben [18, 19].

Általában külső besugárzás hatására fiatal korban jelenik meg (30-40-es évek), gyakori a korai áttétképzés a nyaki nyirokcsomókba. A betegek anamnézisének tekintve közel 30%-uknak volt már korábban pajzsmirigy betegsége. Leggyakrabban egy, a nyakon tapintható kemény göbként jelentkezik, első tünet sokszor már a nyaki

nyirokcsomók áttéte (40%), amelyre az esetek többségében véletlenül, egy rutin carotis ultrahang során derül fény. A tumor vascularizáltságából az agresszivitására lehet következtetni. Altípusai közül leggyakrabban a follicularis variáns jelenik meg, amelynek több alfaja ismert. Az oszlopossejtes és magas sejtes (tall cell) típus ritka, inkább idős korban jelentkező vascularisan invazív agresszív természetű. Mindezek alapján a rossz prognózisú tumorok közé soroljuk (2. ábra).

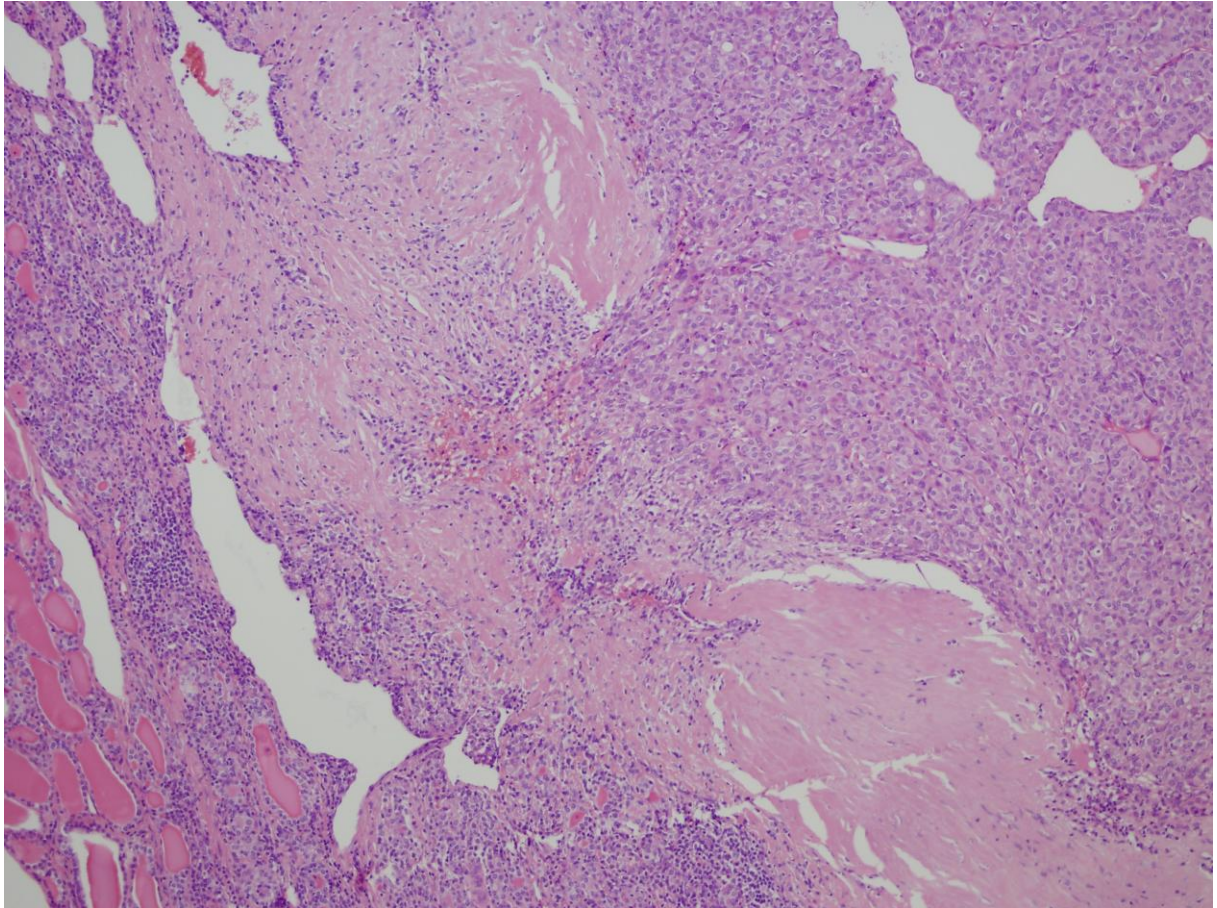


2. ábra Papillaris carcinoma mikroszkópos képe (HE festés, 1000x). A képen jól látszódnak a papillaris carcinoma jellegzetes sejtmagi eltérései intranukleáris citoplazma zárvány (fekete vékony nyíl) és maghártya barázda, groove (kék, vastagabb nyíl).

1.6. Follicularis carcinoma

A follicularis carcinoma is jól differenciált rákforma. A viselkedését tekintve jóval agresszívebb, mint a papillaris carcinoma, valamint jellemzően áttöri a pajzsmirigy tokját, betör az erekbe és képes igen korán a csontokban áttéteket képezni. Terjedésére jellemző a haematogén út, szemben a papillaris típussal. Az esetek

többségében fájdalmas csomóként jelentkezik, inkább az 50-es életkor táján. Nyirokcsomókba ritka az áttét, a felismeréskor 5-20% az esélye a távoli áttétek jelenlétének. Diagnosztizálása a látott citológiai kép alapján nem egyszerű, ezért a pontos diagnózis műtét után, a hisztológiai képből lehet megmondani. (3. ábra).



3. ábra Follicularis carcinoma mikroszkópos képe (HE festés, 1000x). A jobb felső részen a microfolliculusokból felépülő elváltozás, középen pedig a tokáttörés látható.

1.7. A D-vitamin és a pajzsmirigy kapcsolata

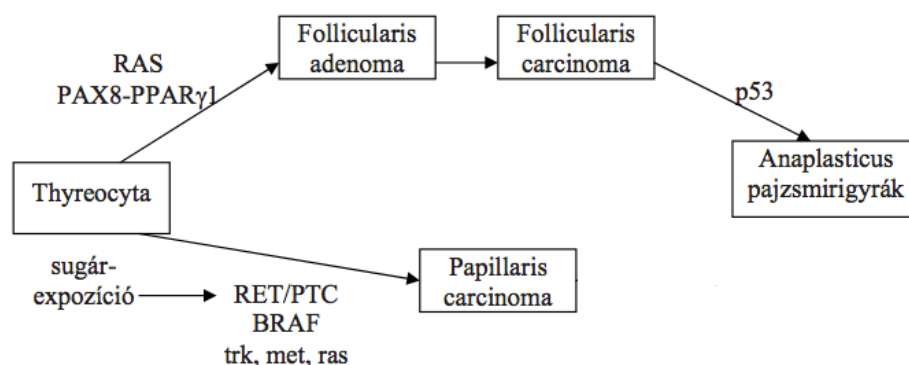
Az aktív D-vitamin előanyaga a napfény hatására termelődik a bőrben vagy táplálék útján kerül be a szervezetünkbe. Ezután több átalakuláson megy keresztül, amire aktív D-vitamin lesz belőle. A napfény UV-B sugarainak hatására a 7-dehidrokoleszteronból D3-previtamin, majd D3-vitamin képződik. Az aktív vegyületté váláshoz a májban a 25. szénatomon hidroxilálódik a D3-vitamin, amit az 1. szénatom hidroxilációja követ. Ez

leggyakrabban a vesében történik, de más szövetek is képesek rá, pl. bőr, emlő, immunsejtek, erek, szívizom, placenta. A hidroxilációt végző enzimrendszerek túlbiztosítottak és szoros kontroll alatt állnak, ennek köszönhetően csak súlyos máj- és veseelégtelenségben fordulhat elő a hiánybetegség. Az aktív vitamin leginkább a sejtek osztódásában, működésében, differenciálódásában, proliferáció gátlásában és apoptózisukban játszik fontos szerepet [20-22]. Prospektív vizsgálatok megállapították, hogy jelentős, protektív szerepe van a D3-vitaminnak a daganatokkal szemben. Több tanulmány szignifikáns összefüggést talált a szérumban D3-vitamin szint és a tumor stádium között, ugyanis jellemzően alacsony szérumszintet mértek a vizsgált személyek vérében [22].

A pajzsmirigy daganatok tekintetében még nem végeztek átfogó vizsgálatokat a D3-vitamin védő hatását vizsgálva, de az eddigi tanulmányok alapján feltételezhető, hogy jelentős szerepet játszik a szérumban D3-vitamin szint a pajzsmirigyet érintő tumorgenezis folyamatában.

1.8. Lehetséges új molekuláris célpontok a pajzsmirigydaganatok kialakulásának hátterében

Számos onkogén, antionkogén és tumormarker részvételét leírták a pajzsmirigy carcinogenezisben (4. ábra). Több hipotézis is született a tumorgenezis folyamatának magyarázatára. Az elméleti és molekuláris genetikai tanulmányok alapján, egyre nagyobb teret hódít a fenti paraméterek klinikai, gyakorlati jelentőségének meghatározása a mindennapok diagnosztikájában. A különböző hipotézisek alapján a magasan differenciált jóindulatú sejtek fokozatosan alakulnak át malignus sejtekké a genomialis DNS-ben felhalmozódó eltérések miatt. Ezen elmélet szerint a thyreocytaiban fokozatosan felszaporodó specifikus csíravonalas és/vagy szomatikus genetikai zavarok lehetnek felelősek a különböző pajzsmirigydaganatokban észlelt szövettani fenotípusok kialakulásáért. Ebből kifolyólag a genetikai vizsgálatok hasznosak lehetnek a rákos elfajulást mutató sejtklónok korai kiszűrésére [23].

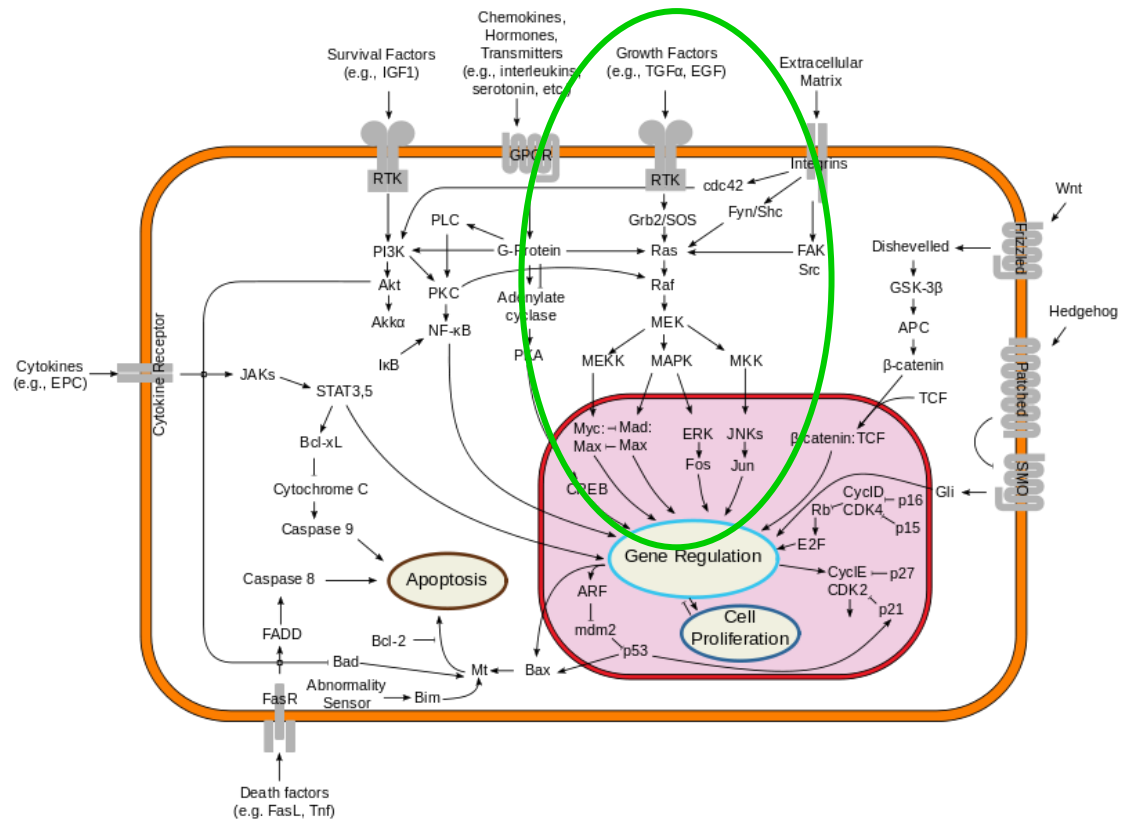


4. ábra A pajzsmirigy rákok carcinogenesis és mutációk helye a folyamatban [23, 24].

Sejtjeink normál működéséhez hozzátartozik, hogy megfelelő külső (extracelluláris) hatásra elkezdjenek osztódni és növekedni. Ebben a folyamatban játszanak szerepet a növekedési faktorok: epidermális növekedési faktor (EGF), trombocitákból származó növekedési faktor (PDGF), fibroblaszt növekedési faktor (FGF), neurotrofinok (pl. NGF) és ide tartozik még az inzulin is. Ezen vegyületek a sejtmembránban elhelyezkedő tirozin-kináz aktivitással rendelkező receptorkon keresztül fejtik ki

hatásukat. Az extracelluláris doménen kötődő EGF két receptormolekula dimerizációját hozza létre, amely elengedhetetlen feltétele a jelpálya aktiválódásnak. Az autofoszforyláció hatására a legalább öt oldallánc aktiválódik, így biztosítva a fehérjekötődést és egyszerre akár öt különböző irányba induló jeltovábbítást. A növekedési faktorokra jellemző sajátos jelátvitel egy jelentős részéért a ras GTP-kötő fehérje aktiválódása felelős. A ras gének (HRAS, NRAS, KRAS) 21 kDa nagyságú proteineket kódolnak, amelyek GTP és GDP kötésére is képesek, de aktívak csak a GTP-t kötő formájuk. Az inaktiválódásukban más fehérjék vesznek részt (többek között a GAP és p21ras), amit citoplazmatikus exchange fehérjék (pl. SOS-fehérje) irányítanak. A GTP-t kötő, aktivált ras-fehérje indítja be a különböző protein-kinázokból álló foszforylációs kaszkádot, a MAP-kináz rendszert, amely végül egy sor különféle fehérje, köztük transzkripciós faktorok foszforylációjának segítségével indítja el a növekedési faktorok által szabályozott folyamatokat (5. ábra, piros kör). A kaszkád első enzime a raf-gén által kódolt szierin/treonin-protein-kináz, amely kettős foszforylációval aktiválja a MAP-kináz-kinázt, ezáltal aktiválódik a MAP-kináz enzimsalád, amelyet ERK-nak (extracelluláris jelre regulálódó protein-kinázoknak is szoktak nevezni [25, 26]. Ez az enzimsalád további protein-kinázokat, transzkripciós faktorokat és egyéb fehérjéket foglal magába, amelyek a leginkább a génexpressziókban játszanak fontos szerepet.

A növekedési faktorok jelátvivő mechanizmusaiban szerepet játszó fehérjéket kódoló gének, a protoonkogének, amelyek mutációja onkogénné történő átalakuláshoz vezet. A mutáció nem csupán a protoonkogének aktiválódását jelenti, hanem nagy szerepe van a tumorsupresszor gének inaktiválódásában is. Ezen gének a sejtproliferáció fiziológias kereteinek biztosításában vesznek részt (pl. sejtciklus G1/S határon késleltetik vagy gátolják az S fázisba történő átmenetet). A protoonkogének hiperaktivitása vagy a tumorsupresszor gének hibája, kódolt fehérjék hiánya, csökkent funkciója szintén a tumorok kialakulásához vezethet [27].



5. ábra A MAP-kináz útvonal ábrája, amelyből zöld körrel a pajzsmirigy daganatokkal kapcsolatba hozott gének regulációs folyamatban betöltött szerepét és helyét lehet látni.

(forrás: Wikipédia)

1.8.1. BRAF gén

A 7. kromoszómán (7q24) elhelyezkedő protoonkogének családjába tartozó szerin-treonin kinázt kódoló BRAF gén (v-RAF murine sarcoma viral oncogene homolog B, más néven serine/threonin-protein kinase B-RAF) a növekedési szignál transzdukció folyamataiban játszik szerepet a mitogénaktivált proteinkináz- (MAPK-) útvonalon, ezáltal képes befolyásolni a sejtek osztódását, differenciálódását és apoptózisát [25, 26, 28, 29]. Minden humán sejtben expreálódik, így a pajzsmirigyben is [30]. A vad típusú BRAF egy bonyolult folyamat révén aktiválódik, amelyben szerepet játszanak többek között a RAS aktivitás, foszforilációk, fehérje-lipid kölcsönhatások. A BRAF gén mutációját legelőször 2002-ben hozták kapcsolatba a carcinogenezis folyamatával [26]. A szomatikus mutáció során az 599. kodonban egy valin cserélődik ki glutamátra, és így fokozódik a kinázaktivitás [23]. Szerepét leírták a melanoma, colontumrok és a pajzsmirigy daganatok kialakulásával összefüggésben is [29-31]. A pajzsmirigy

daganatok közül a papillaris pajzsmirigyrákok klasszikus (40-45%), follicularis, tall cell és microcarcinoma variánsaival hozták kapcsolatba a gén mutációját, egyes cikkek a follicularis carcinomában is leírták [32-35]. A carcinogenezis korai fázására is hatással vannak a BRAF mutáció okozta változások, erre enged következtetni az is, hogy a microcarcinomák jelentős százalékában (40,1%) is detektálható [36, 37].

Egyes vizsgálatok, amelyekben a tumor viselkedését is vizsgálták a genetikai elváltozások mellett, kimutatták, hogy jelentős összefüggés mutatkozik a BRAF mutáció és a tumor agresszivitása, illetve a távoli metastasisok között [38-43]. Ugyanakkor több olyan vizsgálat is megjelent, amelyekben nem találtak összefüggést a BRAF pozitív papillaris carcinomák viselkedése és genetikai állapota közt [39, 44-50].

1.8.2. RAS géncsalád – NRAS, HRAS és KRAS gének

A RAS (Rat sarcoma) géncsaládot a protoonkogének családjába sorolják, az általuk kódolt Ras fehérje a kis GTPázok közé tartozik. A humán kutatásokban leginkább három különböző Ras gén, a HRAS (Harvey rat sarcoma viral oncogene homolog), az NRAS (Neuroblastoma RAS viral (v-ras) oncogene homolog) és a KRAS (Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog) került középpontba. Mindhárom gén 189 aminosavból álló fehérjét kódol és extrém módon hasonlítanak egymásra [51]. A pontmutációk következtében létrejövő patológiás fehérje nagyobb affinitással köt a GTP-hez vagy inaktíválja annak GTP-áz funkcióját, így a mutáns Ras fehérje állandóan aktív állapotba kerül. Ezáltal aktiválódnak a MAP-kinázok és beindul a kaskád rendszer. Mindhárom RAS onkogén mutációja fellelhető follicularis neopláziában, elsősorban FTC-ben és a papillaris carcinoma follicularis variánsában, de gyakran kimutatták már az agresszív fenotípusú differenciálatlan, anaplasticus pajzsmirigyrákokban is [23]. A pajzsmirigy daganatok mellett leírták pancreas, colon és tüdő carcinomákban is. Az összes daganatok tekintetében kb. 20-30%-ra tehető ezen mutációk jelenléte [52-54].

A nemzetközi kutatások során kiderült, hogy a follicularis carcinomák kialakulásában játszanak jelentős szerepet a mutáns RAS gének, az FTC-k 30-40%-ában, a PTC-k 10-20%-ban megtalálhatóak [33]. A szövettani képek alapján a RAS mutáns PTC-eket follicularis variánsú papillaris carcinomáknak hívják, mert szerkezetileg neoplastikus folliculusok növekednek, nem pedig papillaris struktúrák.

Mindezek mellett benignus follicularis adenomákban is gyakori a RAS mutáció (20-40%) [33]. A mutáció jelenléte jóindulatú adenomákban és follicularis mintázatú tumorokban arra enged következtetni, hogy mindezek prekursorai lehetnek a follicularis carcinomáknak, ill. a follicularis variánsú papillaris carcinomáknak. Ezek alapján a RAS mutáció predisponáló faktora lehet a jól differenciált daganatoknak [33].

1.8.3. RET/PTC génátrendeződések

A RET/PTC (rearranged during transfection/ papillary thyroid cancer) defektus egy kromoszómabeli változás, amely a papillaris carcinogenesisben játszik szerepet. Több tanulmány alapján elmondhatjuk, hogy kialakulásuk és típusuk függ az életkortól, nemtől és korábbi sugárterhelés mértékétől [23, 33]. A 10q11.2 kromoszómán elhelyezkedő RET-protoonkogén egy tirozin-kináz aktivitású transzmembrán receptort kódol. Normál folliculáris sejtekben nem expresszálódnak, ellenben az átrendeződést követően degeneratív módon a papillaris pajzsmirigyrákokban megjelennek, ezáltal patológiás tirozin-kináz receptort hoznak létre. A pajzsmirigydaganatok szempontjából leggyakoribb RET/PTC átrendeződések a következők:

- A RET/PTC1 a 10. kromoszóma hosszú karján lévő intrakromoszómális inverzió eredménye. A RET és CCDC6 (coiled-coil domain containing 6; más néven H4 (D10S170; Histon 4) gén kicserélődése okozza.
- A RET/PTC2 a 10. és 17. kromoszómán lévő gének transzlokációjának eredménye. A RET gén tirozi-kináz-doménje kicserélődik a PKAR1A (cAMP-dependent protein kinase type I-alpha regulatory chain) szabályozó alegység egy részével. (A többi, fel nem sorolt RET/PTC génátrendeződés a RET/PTC2-höz hasonlóan alakul ki.)
- A RET/PTC3 génátrendeződés is egy intrakromoszómális géncsere eredménye, aminek következtében a RET és az NCOA4 (Nuclear receptor coactivator 4, másik jelölése ELE1) gének fuzionálnak.

A RET/PTC génátrendeződések előfordulása a PTC-kre jellemző, előfordulási gyakorisága 10-45% [33]. Vizsgálták a jódeállottsággal való összefüggését is, és megerősítették, hogy alacsonyabb arányban jelenik meg a normál, nem jódehiányos területeken (pl. Japán) [55]. Több vizsgálat alátámasztotta, hogy a RET/PTC3 fiatal kori sugárexpozíció hatására alakul ki és karakterisztikáját tekintve agresszívebb [23, 55]. A

carcinogenezis folyamatában betöltött pontos szerepe még nem teljesen ismert, ezt mutatja az a tény is, hogy papillaris microcarcinomákban is találtak ilyen génátrendeződést [55, 56]. Azt fontos megemlíteni, hogy a RET/PTC átrendeződéssel bíró daganatok nem alakulnak át anaplasticus, differenciálatlan pajzsmirigyrákokká [23].

1.8.4. PAX8/PPAR-gamma génátrendeződések

A PAX8 egy 12 exomból álló transzkripciós faktor, amely a paired box család tagja. A normál pajzsmirigyműködéshez nélkülözhetetlen, ugyanis pajzsmirigy specifikus gének, mint például thyroglobulin, TPO (thyroid peroxidase), vagy SLC5A5 (sodium iodide symporter), expressziójában játszik fontos szerepet. A PAX8 gén expresszálódik még a fejlődő agyszövetben és a vesében is, de mutációját csak a pajzsmirigy szövetben írták le [57].

A PPARgamma (peroxisome proliferator-activated receptor) nukleáris receptor, amely jelentős regulátor szerepet tölt be a szervezet lipid metabolizmusában és az inzulin érzékenységben. Onkológiai tekintetben tumorszupresszorok családjába tartozik [57]. Fontos szerepe van a pajzsmirigy carcinogenezisben. A PAX/PPARgamma génátrendeződések főleg follicularis carcinomákra jellemző. A PAX8 pajzsmirigy transzkripciós faktor és a PPARgamma A-F DNS-kötő domén fúziója során jön létre transzlokáció (t(2;3)(q13;25)), amely hatására keletkező mRNS és a fehérje specifikusan a FTC-kben jelentkezik és az apoptózis mértékét csökkenti. A vad típusú PPARgamma overexpresszió hatására a pajzsmirigyrákos sejtvonalakban a sejtnövekedés gátlódott, és ezt a hatást a PPARgamma agonisták fokozták is [23, 57].

1.8.5. A „3 gén modell”: SFN, HMGA2, MRC2

A pajzsmirigy göbök száma jelentősen emelkedett az elmúlt évtizedek során. A göbök jelentős része nem okoz panaszt, ezt az is jelzi, hogy sokszor csak a boncolás során fedezik fel őket. Prasad és munkatársai [58] 2012-ben közzétették egy genom screening vizsgálat eredményeit, amely során azt vizsgálták, mely gének expresszióbeli változásának lehet összefüggése a pajzsmirigy tumorok benignus vagy malignus voltával. A kutatás során 3 gén mutatott szoros összefüggést a vizsgált paraméterekkel:

SFN (stratifin), MRC2 (mannose receptor, C type 2) és HMGA2 (High-mobility group AT-hook 2). E három gén kombinációja 100%-os specificitást és 80%-os szenzitivitást mutatott a pajzsmirigy daganatok karakterisztikáját illetően.

Az *SFN* gén a 14-3-3 protein sigma-t, azaz az Epithelial cell marker protein 1-et kódolja. A 14-3-3 fehérjék több izoformáját ismerjük, amelyek szerepet játszanak a sejtek növekedésének, a sejtciklus szabályozásában, valamint különböző ligandok sejten belüli megkötésében és szállításában [59, 60]. A daganatok szempontjából lényeges, hogy tumorszuppresszor volta ellenére emelkedett expressziót mértek a lágyszöveti infiltrációt mutató tumorszövetekben. Továbbá kapcsolatot találtak az magasabb SFN génkifejeződés, valamint a tüdőrákok, squamosus sejtes daganatok, pancreas, endometrium, cervix carcinomák és összességében a negatív prognózis között [58, 59, 61].

Az *MRC2* gén, más néven uPARAP/Endo180 (urokinase-type plasminogen activator receptor-associated protein) néven is ismert konsitútív, mannóz receptorok családjába tartozó receptor. Szerepe van sejtek endo- és exocitózisának szabályozásában, valamint a sejtmembránban és a mátrixban lévő ép, vagy már degradáló kollagén rostok turnoverben [62]. Az *MRC2* szerepét megfigyelték daganatok áttétképzésében, prosztatata, emlő és fej-, nyakdaganatok kialakulásában [58, 63].

A *HMGA2* gén a HMGA2 proteint kódolja, ami a high mobility group (HMG) fehérjék közé tartozik. Már több mint 25 éve ismerjük ezeket a fehérjéket, amelyek a kromatin állományhoz kötnek, nevüket pedig az elektroforézis során mutatott gyors mozgásukról kapták. Mivel szerepük van a génátíródás szabályozásában, valamint a DNS struktúrájának változásában, ezért szerkezeti transzkripciós faktoroknak is nevezik őket. Részt vesznek a sejtciklusok, differenciálódások, öregedés és neoplasticus átalakulások folyamataiban. Embrionális korban jelentősen emelkedett ezen fehérjék expressziója. A HMGA2 gén pontos szerepe nem ismert a tumorképződés folyamatában, de emelkedett expresszióját mutatták ki pancreas, tüdő, orális squamosus sejt epithelialis tumorokban, valamint emlőrákokban és a leukémia egyes eseteiben is [58, 64-66].

1.8.6. CYP24A1 és CYP27B1 gén expresszió

A D3 vitamin aktív metabolitja, az 1,25-(OH)-D3 vitamin szerepet játszik a sejtek növekedésében, differenciálódásában és apoptózisában. Apoptotikus szerepét leírták

már colon, emlő és prosztatata daganatokban egyaránt [67-69]. Ennek ellenére a daganatellenes hatását még nem használja ki a klinikai gyakorlat. Munkacsoportunk korábbi kísérletei fényt derítettek arra, hogy az aktív D3-vitamin inaktiválásában szerepet játszó 24-hidroxiláz (CYP24A1) enzim expressziós szintje megnövekszik colon carcinomás sejtvonalakban [70]. Ez a hatás feltételezhetően a tumor sejtek védekező mechanizmusa, a D3-vitamin antitumor hatása ellen. Pajzsmirigydaganatokkal kapcsolatban még nem vizsgálták az expressziós változásokat. A citokróm enzimrendszer másik tagja, a CYP27B, amely az 1-alfa-hidroxiláz aktivitása révén a D3-vitamin aktiválásában játszik kulcsszerepet. Khadzkou és munkatársai vizsgálták a CYP27B1 expressziójának változását PTC-s esetekben, de nem találtak szignifikáns összefüggést a metastasisok és a normál szövetállomány expressziós képessége között [71].

2. CÉLKITŰZÉS

Jelen munkánk során a következő célokat tűztük ki:

- 1.) Szomatikus onkogén BRAF mutáció vizsgálata hazai differenciált pajzsmirigy tumor mintákban és ezen mutáció összefüggésének analízise a mutáció pozitivitás, valamint a tumor agresszivitása tekintetében.
- 2.) Szomatikus onkogén RAS géncsalád (NRAS, HRAS, KRAS) mutációinak vizsgálata hazai differenciált pajzsmirigy tumor mintákban és ezen mutációk összefüggésének analízise a mutáció pozitivitás, valamint a tumor agresszivitása tekintetében.
- 3.) Szomatikus onkogén RET/PTC génátrendeződés vizsgálata hazai differenciált pajzsmirigy tumor mintákban és ezen génátrendeződés összefüggésének analízise a mutáció pozitivitás, valamint a tumor agresszivitása tekintetében.
- 4.) Szomatikus onkogén PAX/PPARgamma génátrendeződés vizsgálata hazai differenciált pajzsmirigy tumor mintákban és ezen génátrendeződés összefüggésének vizsgálata a mutáció pozitivitás, valamint a tumor agresszivitása tekintetében.
- 5.) Az SFN, HMGA2, MRC2 gének expressziós mintázatának vizsgálata hazai papillaris pajzsmirigy tumor mintákon.
- 6.) A CYP24A1 és CYP27B1 gén kifejeződésének vizsgálata papillaris pajzsmirigy tumor mintákon és összefüggést keresni a CYP24A1 és CYP27B1 gén expressziós mintázata, valamint a tumor agresszivitása között.
- 7.) A SFN, HMGA2, MRC2 génexpresszió és CYP24A1 génkifejeződés összehasonlítása hazai papillaris pajzsmirigy tumor mintákon.

3. MÓDSZEREK

3.1. Minták gyűjtése

A felhasznált vizsgálati mintáinkat két nagy csoportra oszthatjuk: intraoperatív, friss szövetminták és formalinba fixált paraffinba ágyazott, archivált minták.

A friss műtési minták a Semmelweis Egyetem I. sz. Sebészeti Klinikájáról származtak, amelyekből patológus segítséggel kaptunk szövetdarabokat. A beágyazott mintákat a Semmelweis Egyetem II. sz. Patológiai Intézet, a Szegedi Tudományegyetem Szent-Györgyi Albert Klinikai Központ Általános Orvostudományi Kar Patológiai Intézet és az Országos Onkológiai Intézet archívumából származtak.

Összesen 436 mintát gyűjtöttünk, 218 tumoros és 218 ugyanazon minta egészséges, a tumor által nem érintett területének részlete.

A genetikai vizsgálatok etikai engedéllyel rendelkeztek: ETT-TUKEB 1160-0/2010-1018EKU (1. melléklet). Minden beteggel beleegyező nyilatkozatot töltöttünk ki (2. melléklet).

3.2. Nukleinsav (DNS, RNS) izolálás

A friss szövetmintákat a műtétet követően azonnal -80 °C-ra fagyasztottuk le, egészen a feldolgozás pillanatáig. A blokkokba ágyazott mintákat szobahőmérsékleten tároltuk.

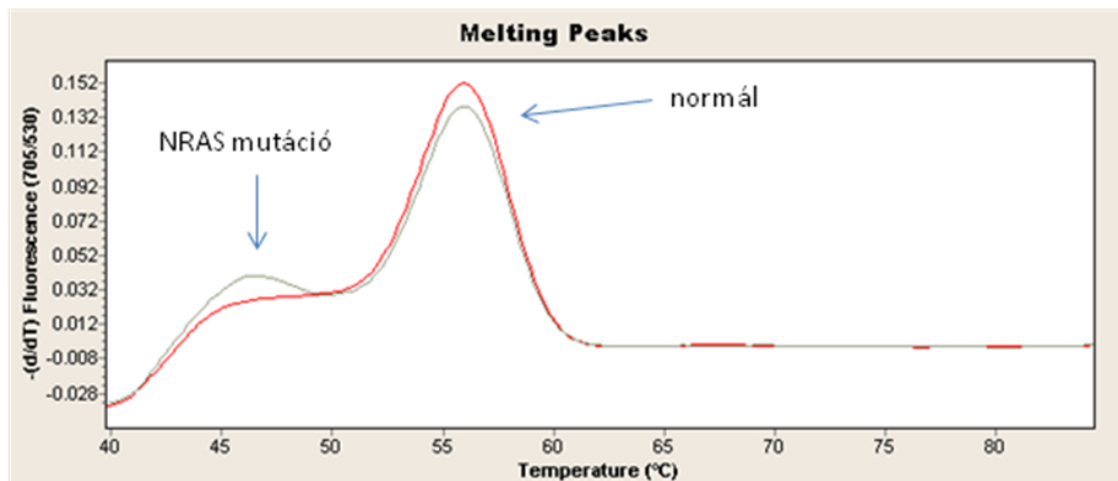
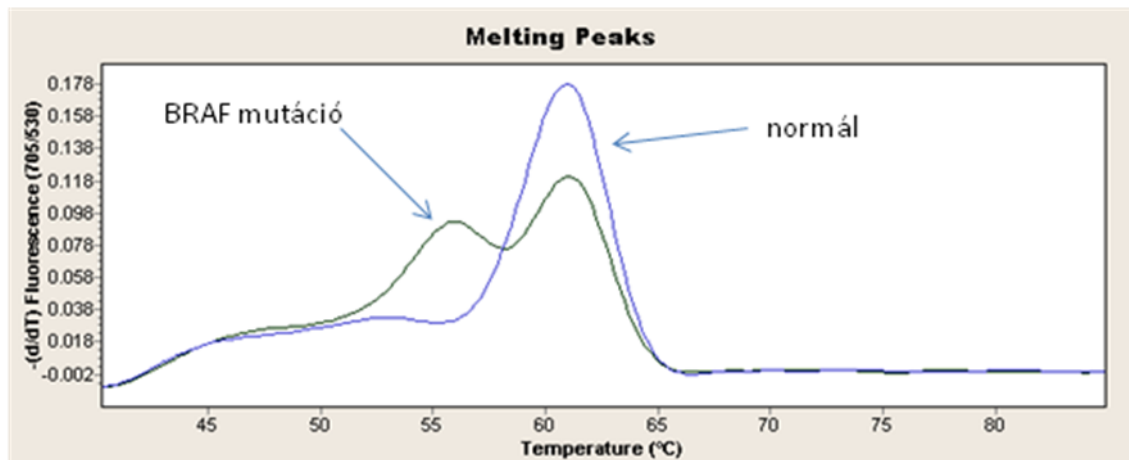
A fagyasztott (a tumor által nem érintett és a tumoros szövetből) minták feldolgozásának első lépése volt, hogy egy foszfáttal-pufferelt oldatban (PBS) aprítottuk fel a Fisher Scientific PowerGen 125 szövethomogenizátor (Fisher Scientific GmbH, Germany) segítségével.

A genomiális DNS izolálása a Roche High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche, Indianapolis, IN, USA) felhasználásával, az RNS-t Roche High Pure RNA Isolation Kittel (Roche) nyertük ki a mintákból. Minden esetben a cég által előírt protokollt használtuk.

A paraffinos minták (a tumor által nem érintett és a tumoros szövetrészt) genomiális DNS-ét a Roche High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche) segítségével állítottuk elő, míg az RNS-eket Roche High Pure RNA Paraffin Kittel (Roche) sikerült a legnagyobb tisztaságban és koncentrációban előállítani.

3.3. Szomatikus onkogén mutációk vizsgálata melting curve analízis segítségével

A DNS mutációk - *BRAF* codon 600 (rs113488022), *NRAS* codon 61 (rs79057879), *HRAS* codon 61 (rs28933406), *KRAS* codon 12 és 13 (rs121913535) – fluoreszcens detektálásához Roche LightCycler készüléket használtunk (Roche Light Cycler 2.0 Instrument, Roche). Mindegyik mutációhoz előre megtervezett primer párt és oligonukleotid próbákat alkalmaztunk [72]. Az amplifikáláshoz felhasználtunk 1 µl izolált DNS-t, 0,5-0,5 µl-t mindkét primerből (TIB MOLBIOL Berlin), 0,5-0,5 µl-t mindkét hibridizációs próbából (TIB MOLBIOL), 1,5 µl vizet, 0,5 µl Bovine Serum Albumin (BSA) (10 mg/ml, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) és 5 µl JumpStartTaq ReadyMix PCR polymerase (Sigma-Aldrich) oldatot. A vizsgálatot a következő protokoll alapján végeztük: 5 percen át 95°C-on történő denaturálás; 60 cikluson át 10 sec 95°C, 10 sec 54°C és 15 sec 72°C, majd a készülék által 40-80°C között fluoreszcens jelzéssel detektált melting görbét elemeztük. A melting görbét a fluoreszcens jel hőmérséklet szerinti negatív deriváltjából ($-dF/dT$) határozta meg a szoftver. A módszer mutációszenzitivitása 10% volt, ami azt jelenti, hogy minimum 10%-ot kell elérniük a mutáns allélt hordozó sejtek arányának a mintában. Mindezt a pozitív kontrollok hígítási során végzett vizsgálatokra alapoztunk (6. ábra).

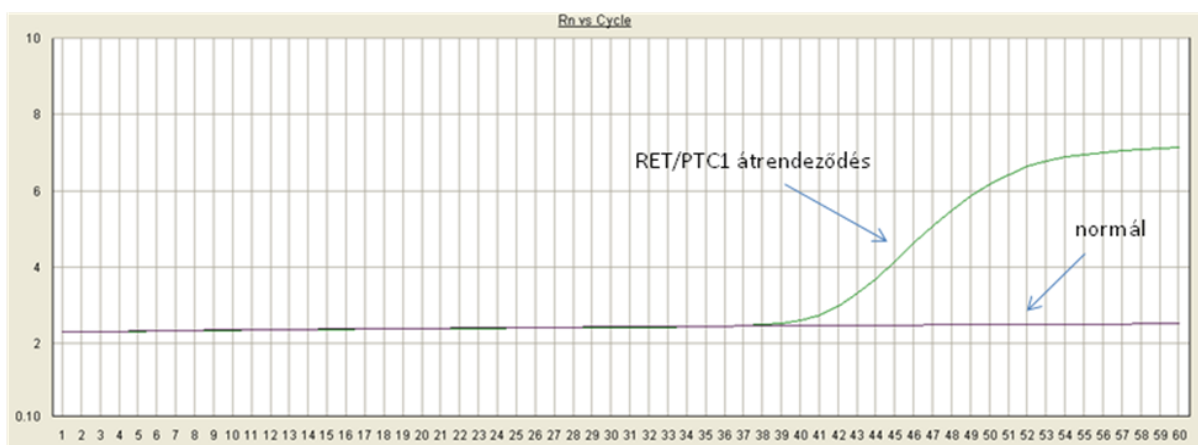


6. ábra BRAF és NRAS mutáció olvadáspont analízis egy tumoros és egy egészséges pajzsmirigy mintán

3.4. Szomatikus onkogén génátrendeződések vizsgálata real-time-PCR készülékkel

Mintánként 10 µl RNS-t reverz transzkripció során cDNS-re fordítottunk 200 U SuperScriptIII RN-áz H reverz transzkriptáz (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, California, USA), 40 U RNaseOUT Ribonukleáz inhibitor (Invitrogen Life Technologies) és 2 µl random primer (Promega, Madison, WI, USA) felhasználásával. Az RET/PTC1, RET/PTC3, PAX8ex9/PPARgamma, PAX8ex7/PPARgamma génátrendeződéseket valós-idejű PCR technikával vizsgáltuk ABI Prism 7500 (Applied

Biosystem, Foster City, CA, USA) rendszeren. Gén-specifikus TaqMan próba alapú génexpressziós eljárást alkalmaztunk [72], ahol minden gén-specifikus szett tartalmazott egy 5' irányú és egy 3' irányú primert, valamint egy fluoreszcens jelölő molekulával ellátott próbát. A PCR reakció 20 µl végtérfogatban zajlott, amely tartalma volt 2 µl cDNS, 10 µl TaqMan 2x Universal PCR Master Mix NoAmpErase UNG (Applied Biosystems), 0,5 µl validált gén specifikus TaqMan próba 20x (Applied Biosystems) és 7,5 µl víz. Minden gént 2-2 párhuzamos méréssel vizsgáltunk 96 lyukú lemezekben a következő protokoll szerint: első lépésként 2 perc 50°C-on és 10 perc denaturálás 95°C-on, majd 60 cikluson keresztül 15 sec denaturálás 95°C-on, 15 sec 55°C-on és 1 perc szintézis 60°C-on. (7. ábra)



7. ábra RET/PTC génátrendeződés expressziós képe egy RET/PTC1 átrendeződést hordozó tumor minta és a kontroll (normál) párja.

PAX8ex7 és PAX8ex9/PPAR-gamma, RET/PTC1 és RET/PTC3 génátrendeződéseket RNS-ből RT-PCR ABI Prism 7500 (LT, Foster City, CA, USA) készülékkel TaqMan-próba alapú valós idejű PCR technikával vizsgáltuk.

A reverz transzkripcióhoz 200 U SuperScriptIII RNase H-reverz transzkriptázt (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, California, USA), 2 µl random primert (Promega, Madison, WI, USA) és 250-300 ng RNS-t használtunk. A reakcióelegyet 37 °C -on egy órán át inkubáltuk. A PCR reakciót 20 µl térfogatban végeztük el, amelyhez a következőket használtuk fel: 2 µl cDNS, 10 µl TaqMan 2x Universal PCR Master Mix NoAmpErase UNG (Life Technologies), 40 pmol koncentrációjú primerek, 2 pmol koncentrációjú hibridizációs TaqMan próbák 20x (LT) és 7,5 µl ultrapure (UP) víz.

96 lyukú plate-en minden gént 2-2 paralel méréssel vizsgáltunk. A RT-PCR reakciók során 2 perc 50 °C -os inkubálás után a denaturálás következett, ami 95 °C -on 10 percig tartott. Ezután következett a PCR amplifikálás, amely 60 ciklusból állt, egyes ciklusok pedig 15 sec 95 °C -on denaturálás, majd annealing és a beépülés 60 sec 60 °C -on.

3.5. A „3 gén modell” expressziós mintázatának vizsgálata valós idejű, real-time-PCR készülékkel

A totál RNS-ek izolálását minden mintánál a Roche High Pure Total RNA Isolation kit felhasználásával végeztük. 500 ng mennyiségű RNS-t használtunk a reverz transzkripcióhoz, a cDNS előállításakor. A különböző gének expresszióját (*ID CYP24A1: Hs00167999_m1, Applied Biosystems ID SFN: Hs.PT.51.20789121.g, ID MRC2: Hs.PT.51.20692535, ID HMGA2: Hs.PT.51.2803297, Integrated DNA Technologies*) Taqman próba alapú kvantitatív real-time PCR segítségével határoztuk meg. Endogén kontrollnak és az adatok normalizálásához a GAPDH gént használtuk. A kapott értékek alapján (threshold ciklusszám) a relatív kvantifikáció az Applied Biosystem 7500 készüléken SDS 1.3-as programmal történt.

3.6. CYP24A1 és CYP27B1 gének expressziójának vizsgálata real-time-PCR-rel

Minden egyes minta esetében 500 ng RNS-ből indultunk ki és a cDNS-re történő átfordításához felhasználtunk 200 U SuperScriptIII RNase H – reverz-transzkriptázt (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), 125 ng random hexamer primert (Promega, Madison, WI, USA), 40 U RNaseOUT Ribonuclease Inhibitor (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) és a reakció végtérfogatát 30 µl-re állítottuk be.

A kiválasztott gének (*ID CYP24A1: Hs00167999_m1, ID CYP27B1: Hs00168017_m1*) expressziós különbségeinek méréséhez előre megtervezett és validált gén specifikus TaqMan próbákat használtunk real-time RT-PCR készüléken (Applied Biosystems). Minden szett gén specifikus reverse és forward primereket, fluoreszcens jelölésű próbákat tartalmazott. A próbák egy exon-exon határon átnyúló területet öleltek fel és genomiális DNS-t nem mutattak ki.

A PCR reakció térfogata 20 µl volt, amely tartalmazott 2 µl cDNS-t, 10 µl TaqMan 2x Universal PCR Master Mix NoAmpErase UNG (Applied Biosystems), 1 µl TaqMan Gene Expression Assay 20x (Applied Biosystems) és 7 µl ultra-tiszta MilliQ vizet. A mérést ABI Prism 7500 real-time PCR készülékkel (Applied Biosystems) végeztük, a kiválasztott gének amplifikálását három paralel futással végeztük el 96-lyukú plate-eken. Az amplifikálás során a következő protokollt használtuk: 10 perc denaturálás 95 °C-on, majd 50 cikluson keresztül 15 sec denaturálás 95 °C, 1 perc annealing és extension 60 °C.

Általános „housekeeping” – belső kontroll - génként a *GAPDH*-t (ID: Hs99999905_m1) használtuk az adatok normalizálásához.

A relatív kvantifikációs vizsgálatot az adatok összegyűjtése után (küszöb/threshold ciklusszám, Ct) a 7500 System SDS software 1.3 (Applied Biosystems) segítségével végeztük el. A gén specifikus mRNS relatív mennyiségét (RQ) a dCt átlagértékéből (target gén Ct - endogén kontroll gén Ct) határoztuk meg 7500 System SDS software 1.3 (Applied Biosystems) a gyártó ajánlásai alapján.

A tumoros minták relatív génexpresszió változásánál a kontroll szövetekhez képest vizsgáltuk és cutoff értéknek a kétszeres növekedés vagy felére csökkenést fogadtuk el.

3.7. Immunhisztokémia

A CYP24A1 fehérje mennyiségi detektálásához pajzsmirigyből származó, formalinban fixált, paraffinba ágyazott szöveti (FFPE) mintákat vizsgáltuk immunhisztokémiai módszerrel. A vizsgálathoz elsődleges antitestként tisztított, anti-humán CYP24A1 nyúl poliklonális antitestet (Prestige Antibodies, Sigma-Aldrich; 1:200) használtunk. A folyamat első lépése során a 2 µm-es vastagságú pajzsmirigyszövetet deparaffináltuk, majd az endogén peroxidáz aktivitást 1,5% (v/v) hidrogen-peroxid tartalmú etanollal gátoltuk. Az antigének feltárásához szükséges hőkezelést elektromos kukta (Avair IDA) alkalmazásával, 10 mmol/l (pH 10,5) TRIS pufferben végeztük el. A fehérjék pH 7,4-es TRIS-puffer oldatban történő blokkolása után 5%-os (w/v) alacsony zsírtartalmú tejpor oldatban szobahőmérsékleten, 70 percig inkubáltuk a mintát. A detektálást Novolink polymer kittel (Leica Biosystems/Novocastra) végeztük. A sejtmagok festéséhez Mayer-féle hematoxylin

oldatot használtunk. Az immunhisztokémiai festéseket 4 csatornás Freedom Evo (TECAN, Männedorf, Svájc) folyadékkezelő rendszeren végeztük.

3.8. Statisztikai analízisek

➤ Szomatikus onkogén mutációk statisztikai analízise differenciált pajzsmirigy carcinomákban

A vizsgálati mintáinkat három csoportra osztottuk fel a klinikai és szövettani adatok alapján, majd összefüggést kerestünk a csoportok és a genetikai eltérések jelenléte között.

1. csoport: azon minták, amelyek metastasist, érbetörést nem mutattak és a tumor mérete 10 mm vagy kisebb volt
2. csoport: azon minták, amelyek metastasist, érbetörést nem mutattak és a tumor átmérője 10 mm-t meghaladta
3. csoport: azon minták, amelyek metastasist, érbetörést mutattak és a tumor átmérője 10 mm-t meghaladta

Az így kapott adatok között Khi-teszt segítségével kerestünk szignifikáns változásokat. Mindehhez az SPSS Statistic 20 programcsomagot használtuk.

➤ Génexpressziós vizsgálatok statisztikai analízise papillaris carcinomákban

A CYP24A1 és CYP27B1 gének expressziós szintjének változását 100 papillaris carcinomás mintán vizsgáltuk, amelyekben a „saját” egészséges szövetpárhoz viszonyítottuk az expressziós különbségeket.

A statisztikai analízis során non-parametrikus eljárást alkalmazva, Mann-Whitney U-tesztet használtunk. Az eredményeknél a p-érték 0,05 vagy kisebbet fogadtuk el szignifikánsnak. Pearsons-korrelációval vizsgáltuk az állandó változók (CYP24A1 expresszió és a PTC diagnóziskori életkor) közötti összefüggéseket

Négy funkcionális alcsoportot alkottunk a CYP24A1 overexpresszált, csökkent expressziót mutató és változást nem mutató minták kiértékeléséhez:

1. csoport: valamely szomatikus onkogén mutáció (BRAF, HRAS, NRAS, KRAS) és/vagy génátrendeződés (RET/PTC1, RET/PTC3) jelenléte
2. csoport: klasszikus papillaris carcinoma vagy más szövettani variánsa (follicularis, Hürthle-sejtes, tall cell, encapsulált és microcarcinoma)

3. csoport: egyéb pajzsmirigyet érintő betegség a PTC mellett (Hashimoto thyroiditis, hypothyreosis, hyperthyreosis)
4. csoport: nyirokcsomó áttétet és/vagy érbetörést mutató PTC

Khi-tesztet használtunk a tumor minták eloszlásának vizsgálatához a CYP24A1 expresszió (csökkent, emelkedett, nem változott) tekintetében.

Egyváltozós Mann-Whitney U-tesztet is lefuttattunk az adatok vizsgálata során, de nem kaptunk használható eredményeket, ezért multivarációs adatelemzést végeztünk.

➤ Főkomponens analízis

A főkomponens analízis (Principal Components Analysis, PCA) egy standard technika, amely széles körben alkalmazható az orvosbiológiai kutatásokban, különösen microarray és egyéb génexpressziós adattömegek statisztikai kiértékelésében. A módszer összegzi a multivariációs adatrendszereket néhány fontos, egymástól független és az eredeti adatstruktúrát jól tükröző dimenzióba, mely dimenziókat komponenseknek nevezzük. Minden komponens az összvariancia egy töredéke. A kvantitatív RT-PCR adatok feldolgozása során standardizált PCA metodikát használtunk, vagyis minden változót (génmutációt, demográfiai, hisztológiai, klinikai adatot) egyforma súllyal szerepeltettünk az elemzésben. Az eredmények grafikus ábrázolása ordinációs diagramon, illetve kettős szórásdiagramon (biplot) történt. A személyek koordinátáit az eigenvektorokból kapjuk meg, ugyanakkor a gének koordinátáit a változók komponensekkel való korrelációjából számolt értékei adják. Ez az ábrázolásmód megengedi a tumoros vs. kontroll mintacsoportok és a gének, ill. CYP24A1 expresszió kórfolyamati jelentőségének egyidejű értékelését. Az egy csoportba tartozó személyek konvex sokszögekbe zárhatók, amely vizualizációs technika alkalmazása egyértelműbbé teszi a csoportok elkülönülését a diagramon. A PCA szelektálja azokat a géneket, amelyek a leginkább felelőssé tehetőek a beteg és kontroll csoportok közötti különbségeért. Scree diagram segítségével döntöttük el, hogy egy komponens valóban hasznos információkat foglal magában vagy az csupán véletlenszerű eltérés az adatokban. Így meghatároztuk azt a töréspontot, ahol az eigenértékek nagyon lassan csökkenni kezdenek. A számításokat a SYN-TAX 2000 programcsomag felhasználásával készítettük.

4. EREDMÉNYEK

4.1. Szomatikus onkogén BRAF mutáció vizsgálata hazai differenciált pajzsmirigy tumor mintákon

A BRAF mutáció esetében összesen 218 differenciált pajzsmirigy carcinomás mintát vizsgáltunk, amelyből 70 származott férfitől (átlag életkor $50,5 \pm 15,2$), 148 pedig női (átlag életkor $48,6 \pm 16,5$) betegtől.

A vizsgálat során a differenciált pajzsmirigy tumorok között 7 esetben találtunk dupla genetikai eltérést (1 KRAS, 3 NRAS mutáció és 3 RET/PTC génátrendeződés), 91 tumoros minta hordozta a gén defektusát és 127 mintában nem mutattunk ki eltérést. Találtunk 4 olyan follicularis carcinomát, amely BRAF mutációt hordozott. A genetikai eltérések összesítését a 4. táblázat mutatja.

Az összes tumoros mintát figyelembe véve 41,7%-uk hordozott BRAF mutációt. Egy egészséges, kontroll mintában sem mutattunk ki genetikai elváltozást.

	mintaszám	BRAF
PTC	197	87 (44.2%)
FTC	21	4 (19.1%)
kontroll szövet	218	0
összesen	436	

4. táblázat: Az általunk vizsgált a differenciált pajzsmirigy tumorszövetben detektált BRAF mutációk összesítése.

Megvizsgáltuk a PTC altípusai és a BRAF mutáció összefüggését és a statisztikai analízis során nem találtunk kapcsolatot a genetikai adatok, ill. a betegség súlyossága között. Az megfigyelhető volt, hogy a BRAF mutáció magasabb arányban volt jelen a tall cell variánsú PTC-ben, de szignifikáns összefüggést nem tudtunk kimutatni az altípusok és a mutációk gyakorisága közt (5. táblázat).

PTC altípus	mintaszám	BRAF
klasszikus	137	61 (44,5%)
follicularis variáns	17	7 (41,2%)
encapsulált	9	5 (55,6%)
micro cc.	19	7 (36,8%)
tall cell	7	5 (71,4%)
Hürthle-sejtes	8	2 (25,0%)

5. táblázat: A PTC altípusaiban előfordult BRAF mutációk százalékos megoszlása

4.2. Szomatikus onkogén RAS géncsalád (NRAS, HRAS, KRAS) mutációinak vizsgálata hazai differenciált pajzsmirigy tumor mintákon

A RAS géncsalád mutációinak esetében összesen 218 differenciált pajzsmirigy carcinomás mintát vizsgáltunk, amelyből 70 származott férftól (átlag életkor $50,5 \pm 15,2$), 148 pedig női (átlag életkor $48,6 \pm 16,5$) betegtől.

Az eredményeink alapján PTC-ben 8 (4,1%), FTC-ben pedig 6 (28,6%) RAS mutációt sikerült kimutatni. Öt esetben kettős mutációt detektáltunk: egy KRAS és BRAF (stádium I., nyirokcsomó áttét nélkül), három NRAS és BRAF (egy stádium II. és kettő stádium III.), valamint egy NRAS és RET/PTC3 (Stádium I.). Altípusokra bontva a PTC-ben két HRAS, egy KRAS és 5 NRAS elváltozást detektáltunk. A follicularis carcinoma esetében egy minta volt HRAS és öt minta pedig NRAS pozitív. Eredményeinket a 6. táblázat mutatja.

	mintaszám	HRAS	KRAS	NRAS	RAS összesen
PTC	197	2 (1.0%)	1 (0.5%)	5 (2.6%)	8 (4,1%)
FTC	21	1 (4.8%)	0	5 (23.1%)	6 (28,6%)
kontroll szövet	218	0	0	0	0
összesen	436				

6. táblázat: Az HRAS, KRAS, NRAS mutációk aránya a vizsgált differenciált pajzsmirigy carcinomákban (mintaszám és %)

4.3. Szomatikus onkogén RET/PTC génátrendeződés vizsgálata hazai differenciált pajzsmirigy tumor mintákon

A RET/PTC génátrendeződések esetében összesen 218 differenciált pajzsmirigy carcinomás mintát vizsgáltunk, amelyből 70 származott férfitől (átlag életkor $50,5 \pm 15,2$), 148 pedig női (átlag életkor $48,6 \pm 16,5$) betegtől.

Az összes tumoros mintát figyelembe véve a PTC-s esetekben kilenc RET/PTC1 és egy RET/PTC3 génátrendeződést sikerült kimutatni. Négy esetben volt kettős genetikai elváltozás, mégpedig 3 RET/PTC1 és BRAF, valamint egy RET/PTC és NRAS mutáció. Az összes tumoros PTC mintára vonatkoztatva elmondhatjuk, hogy 5,1%-uk hordozta ezt a variációt. Az FTC-esetében csak egy RET/PTC3 génátrendeződést találtunk, ami az összes mintára nézve 4,8%-os gyakoriságot jelent. Ha mindkét carcinoma típust együttesen vizsgáljuk, akkor elmondható, hogy 11 mintában (5,0%) sikerült kimutatni valamely RET/PTC génátrendeződést. (7. táblázat)

	mintaszám	RET/PTC1	RET/PTC3	RET/PTC összesen
PTC	197	9 (4.7%)	1 (0,5%)	10 (5,1%)
FTC	21	0	1 (4,8%)	1 (4,8%)
kontroll szövet	218	0	0	0
összesen	436			

7. táblázat: 218 differenciált pajzsmirigy carcinomás esetben detektál RET/PTC génátrendeződések

4.4. Szomatikus onkogén PAX/PPARgamma génátrendeződés vizsgálata hazai differenciált pajzsmirigy tumor mintákon

A PAX/PPARgamma génátrendeződés esetében összesen 218 differenciált pajzsmirigy carcinomás mintát vizsgáltunk, amelyből 70 származott férfitől (átlag életkor $50,5 \pm 15,2$), 148 pedig női (átlag életkor $48,6 \pm 16,5$) betegtől.

Egy tumoros és kontroll mintában sem sikerült PAX/PPARgamma génátrendeződést kimutatni.

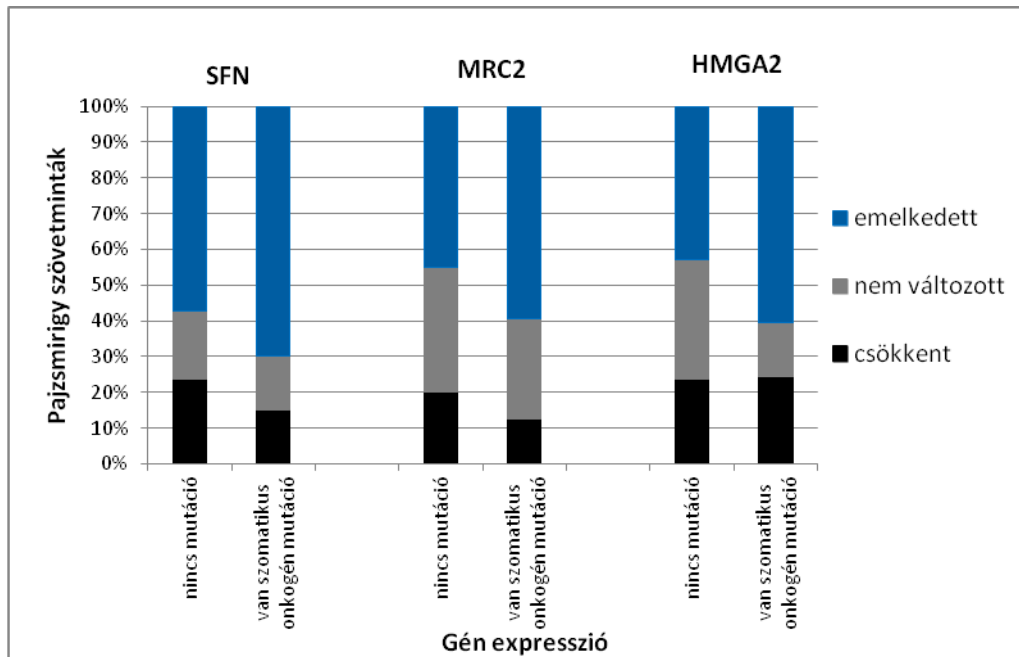
4.5. Az SFN, MRC2, HMGA2 gének expressziós mintázatának vizsgálata hazai papillaris pajzsmirigy tumor mintákon

A „3 gén-modell” vizsgálatát 58 papillaris carcinoma és a hozzá tartozó ép szövetmintán vizsgáltuk, amelyből 23 származott férfi betegtől, 35 pedig női betegtől (18-81 éves korig, átlag életkor $47,7 \pm 12,4$ év).

Az SFN, MRC2, HMGA2 gének expressziós mintázatának vizsgálatakor ugyanattól a személytől származó egészséges (kontroll) szövethez hasonlítottuk a tumoros minták expressziós értékeit. Az összes méréshez belső kontrollként GAPDH-t használtunk, amelyet az adataink normalizálásához is felhasználtunk.

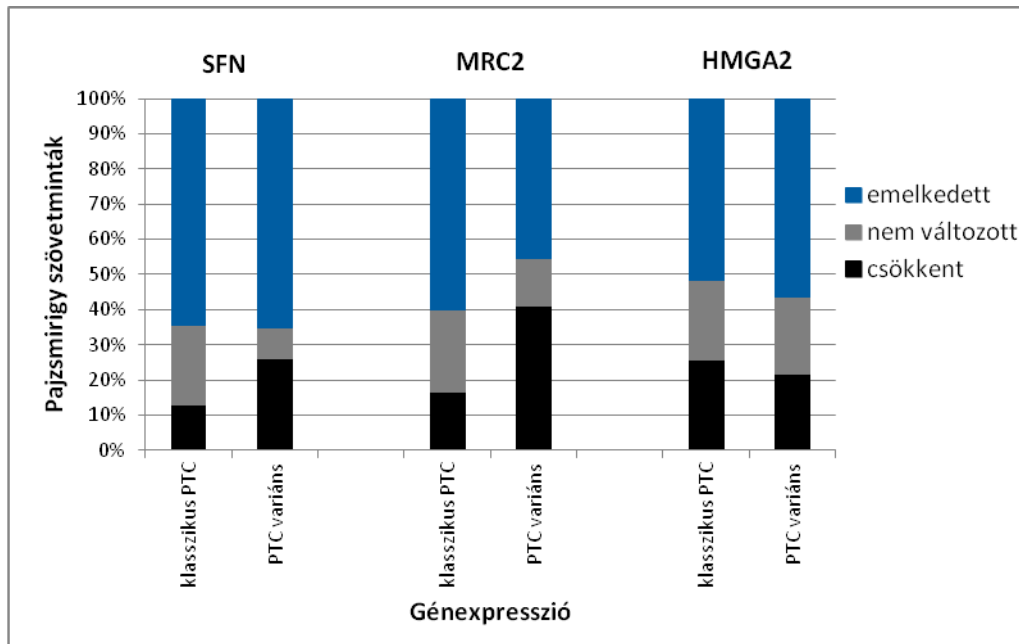
A klinikai és hisztológiai alapján több csoportot hoztunk létre és ezek expressziós értékeit hasonlítottuk össze. A statisztikai elemzések szignifikáns különbséget, változást nem mutattak.

- 1. csoport:** Ebben a csoportban a szomatikus onkogén mutációt (BRAF, NRAS, HRAS és KRAS) hordozó és mutációt nem tartalmazó minták expresszióját hasonlítottuk össze. Megfigyelhető volt, hogy a szomatikus mutációra pozitív tumor minták nagyobb aránya mutatott emelkedett expressziót az SFN (69,7% vs. 57,1%) MRC2 (59,4% vs. 45,0%) HMGA2 (60,6% vs. 42,9%) gének esetén, de statisztikailag szignifikáns különbséget nem találtunk egyik gén vonatkozásában sem a mutációkra negatív tumor mintákhoz viszonyítva (8. ábra).



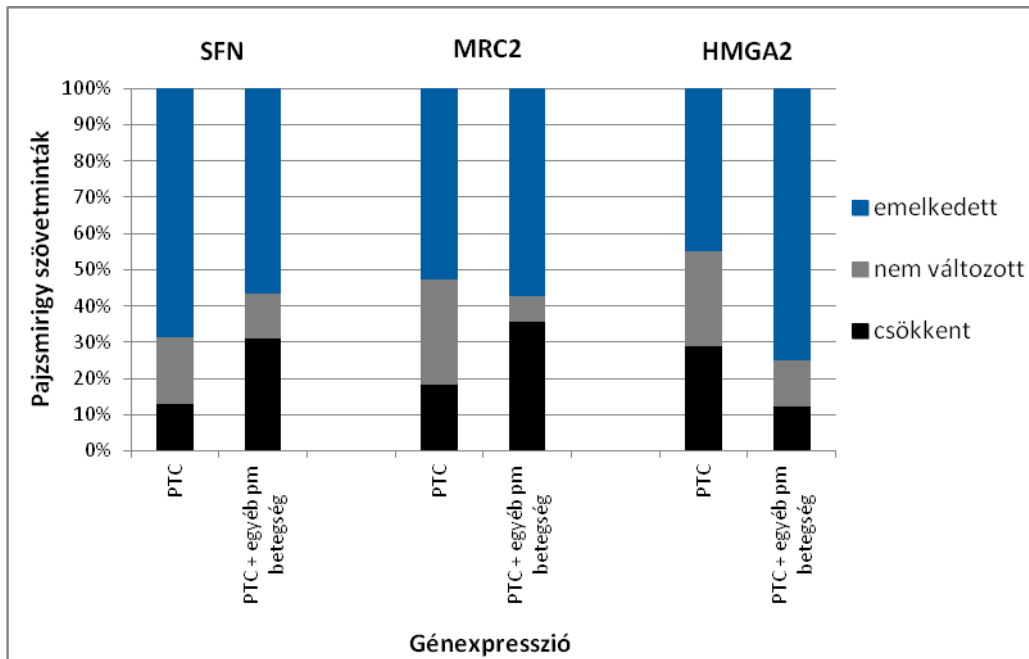
8. ábra A tumorminták százalékos megoszlása a „3 gén-modell” expressziós értékei alapján (1. csoport)

- 2. csoport:** A „3gén-modell” expressziós változását hasonlítottuk össze a papillaris carcinoma különböző altípusai/variánsai (follicularis, Hürthle-sejtes, tall cell, encapsulált és microcarcinoma) vs. klasszikus PTC között. Az SFN (65,2% vs. 64,5%) és HMGA2 (56,5% vs. 51,6%) gének nagyobb százalékban mutattak fokozott expressziót a különböző PTC szövettani altípusokban, szemben a konvencionális papillaris pajzsmirigy tumorokkal, de ezen változások szignifikáns eltérést nem mutattak (9. ábra).



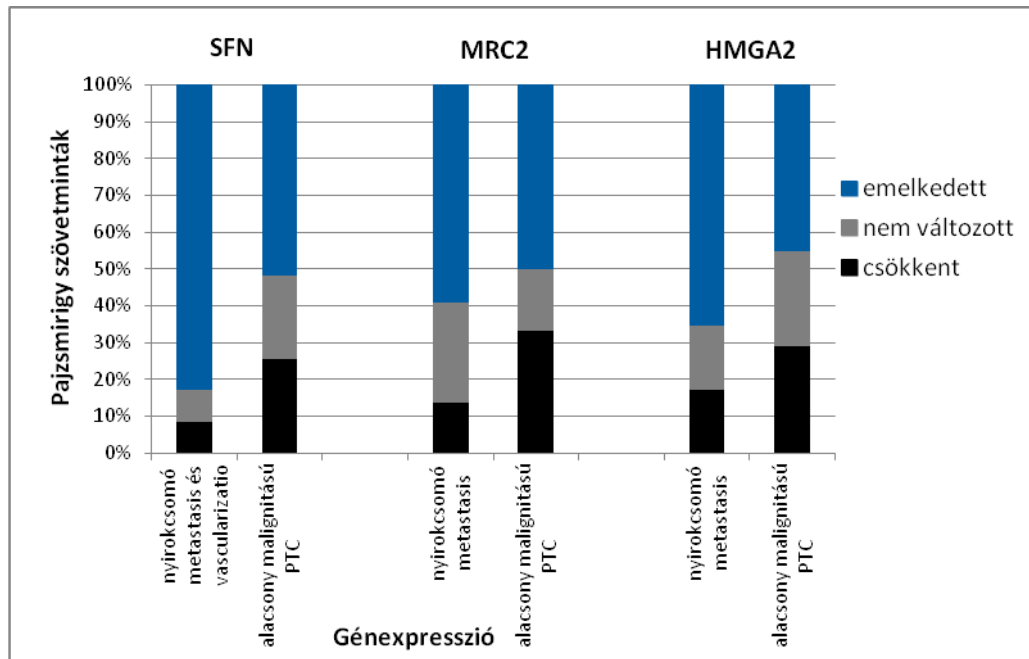
9. ábra A tumor minták százalékos megoszlása a „3 gén-modell” expressziós értékei alapján (2. csoport)

3. csoport: A papillaris carcinomán kívül még egyéb pajzsmirigy betegséggel bíró (Hashimoto-thyreoiditis, hypothyreosis, hyperthyreosis), illetve a csak PTC-s betegek expressziós eredményeit hasonlítottuk össze. A HMGA2 (75,0% vs. 44,7%) és MRC2 (57,1% vs. 52,6%) gének esetében emelkedő trendet lehetett megfigyelni az egyéb pajzsmirigy betegséggel társult PTC szövetminták vizsgálatakor, szemben az SFN (56,3% vs. 68,4%) génnel, amely a társbetegség nélküli csoportban mutatott nagyobb expressziós aktivitást. Az expressziós változások $p < 0,05$ szignifikancia értéket nem érték el. (10. ábra)



10. ábra A tumor minták százalékos megoszlása a „3 gén-modell” expressziós értékei alapján (3. csoport)

4. csoport: Összevetettük az agresszívabb tulajdonságokkal rendelkező és a kevésbé malignus minták expressziós mintázatait. Az alacsony malignitású PTC-eket McLeod és munkatársai által közölt kritériumrendszer alapján határoztuk meg [73]. Agresszív tulajdonságúak közé soroltuk a nyirokcsomó áttétet és vascularis inváziót mutató tumorokat. Minden más tumor az alacsonyabb agresszivitású, kevésbé malignus csoportba került. Megfigyelhető volt, hogy az SFN gén (82,6% vs. 51,6%) és HMGA2 gén (65,2% vs. 45,2%) expressziója jelentősen megemelkedett a rosszabb prognózisú daganatok esetében, szemben az alacsonyabb malignitásfokú tumorokkal. Az expressziós értékek szignifikáns változást nem mutattak a vizsgálat során (11. ábra)



11. ábra A tumor minták százalékos megoszlása a „3 gén-modell” expressziós értékei alapján (4. csoport)

4.6. A CYP24A1 és CYP27B1 gén expressziójának vizsgálata papillaris pajzsmirigy tumor mintákon

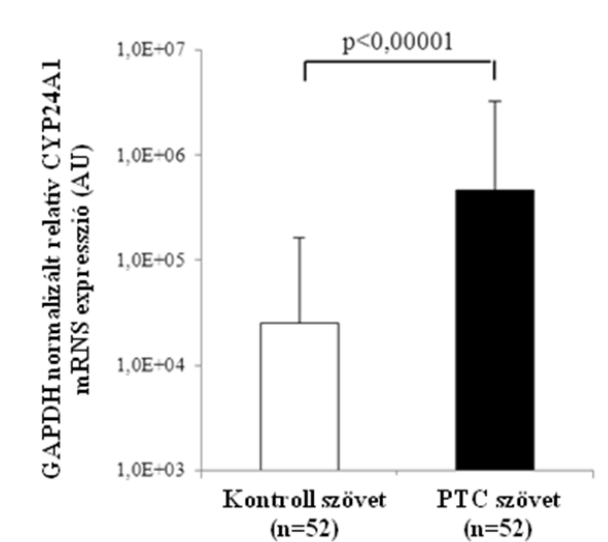
Összesen száz (31 férfi, 69 nő) papillaris pajzsmirigy carcinomájában és ezek egészséges, tumor által nem érintett szöveti párjában vizsgáltuk a CYP24A1 és CYP27B1 gének relatív expressziós mintázatát.

A betegek átlag életkora 49,1 év volt (13-85 év). A szövettani felosztás szerint 56 klasszikus és 44 PTC variánst (follicularis, Hürthle-sejtes, encapsulált, tell-cell és microcarcinoma) vizsgáltunk. A tumorokat az AJCC/UICC 2010-es kritériumrendszer alapján is kategorizáltuk, így I. stádiumú volt 72 minta, II. stádiumú 6 minta és III. stádiumba tartozott 22 minta.

A szomatikus mutációk és átrendeződések tekintetében 100 mintában 52 BRAF, 2 HRAS, 1 KRAS, 4 NRAS mutációt és 1 RET/PTC3 és 8 RET/PTC1 génátrendeződést találtunk. 38 tumor minta nem hordozott mutációt és 6 esetben dupla, két különböző mutációt detektáltunk. Az NRAS és BRAF mutációt 3 esetben észleltük, egy II. stádiumú és két III. stádiumú mintában. Volt egy III. stádiumú és egy II. stádiumú mintánk is, amely BRAF mutációt és RET/PTC1 génátrendeződést hordozott és

regionális nyirokcsomó áttétet adott. KRAS és BRAF mutációt együttesen hordozó mintánk egy darab volt, amely I. stádiumú és nyirokcsomókba nem adott metastasist. A vizsgált minták közt 31 olyan eset volt, amikor egyéb pajzsmirigy megbetegedése (Hashimoto thyroiditis, hypothyreosis, hyperthyreosis) is diagnosztizálható volt a betegeknél.

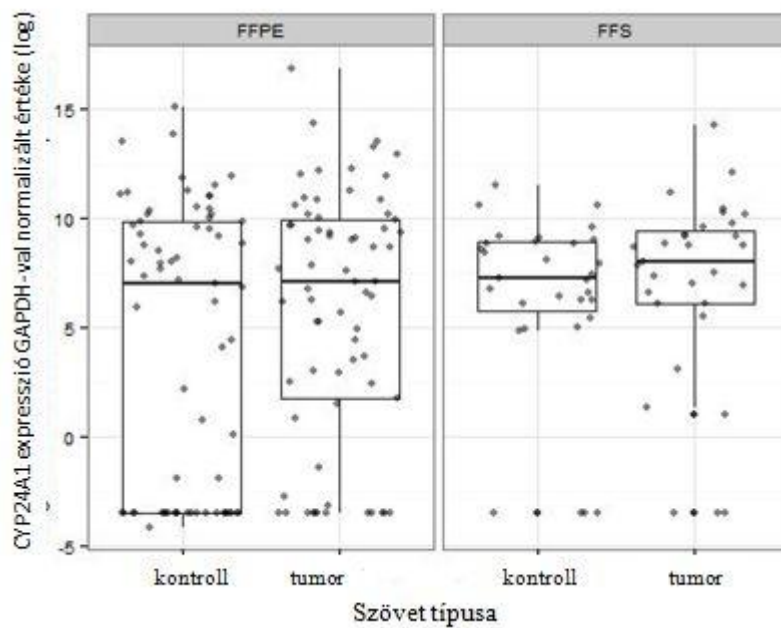
A CYP24A1 mRNS expressziója 52 esetben megemelkedett a tumoros mintában az egészséges szövethez viszonyítva. Volt olyan eset, ahol az ép szövethez képest több mint 1000-szeres emelkedést detektáltunk. Ezen mintákban a CYP24A1 specifikus mRNS relatív mennyiségének emelkedése statisztikailag szignifikanciát mutatott ($p < 0,00001$) (12. ábra).



12. ábra A CYP24A1 specifikus mRNS relatív emelkedése a PTC-s szövetekben.
($p < 0,00001$)

24 malignus minta alacsonyabb CYP24A1 specifikus génexpressziós értékeket adott, mint az ép szövetpárja. 13 személyben nem volt detektálható CYP24A1 expresszió sem a tumoros, sem egészséges szövetben.

A 100 PTC minta közül 69 esetben az izolált RNS FFPE (formalinban fixált, paraffinba ágyazott) mintából származott, 31 esetben pedig friss, mélyfagyasztott mintából. Ha a formalinban fixált, paraffinba ágyazott minta, valamint a friss, mélyfagyasztott minta csoportok CYP24A1 expressziós változását külön vizsgáltuk nem találtunk szignifikáns különbséget ($p = 0,37$ és $p = 0,27$) (13. ábra). Vagyis a minta eredete nem befolyásolta a mérési eredményeket.

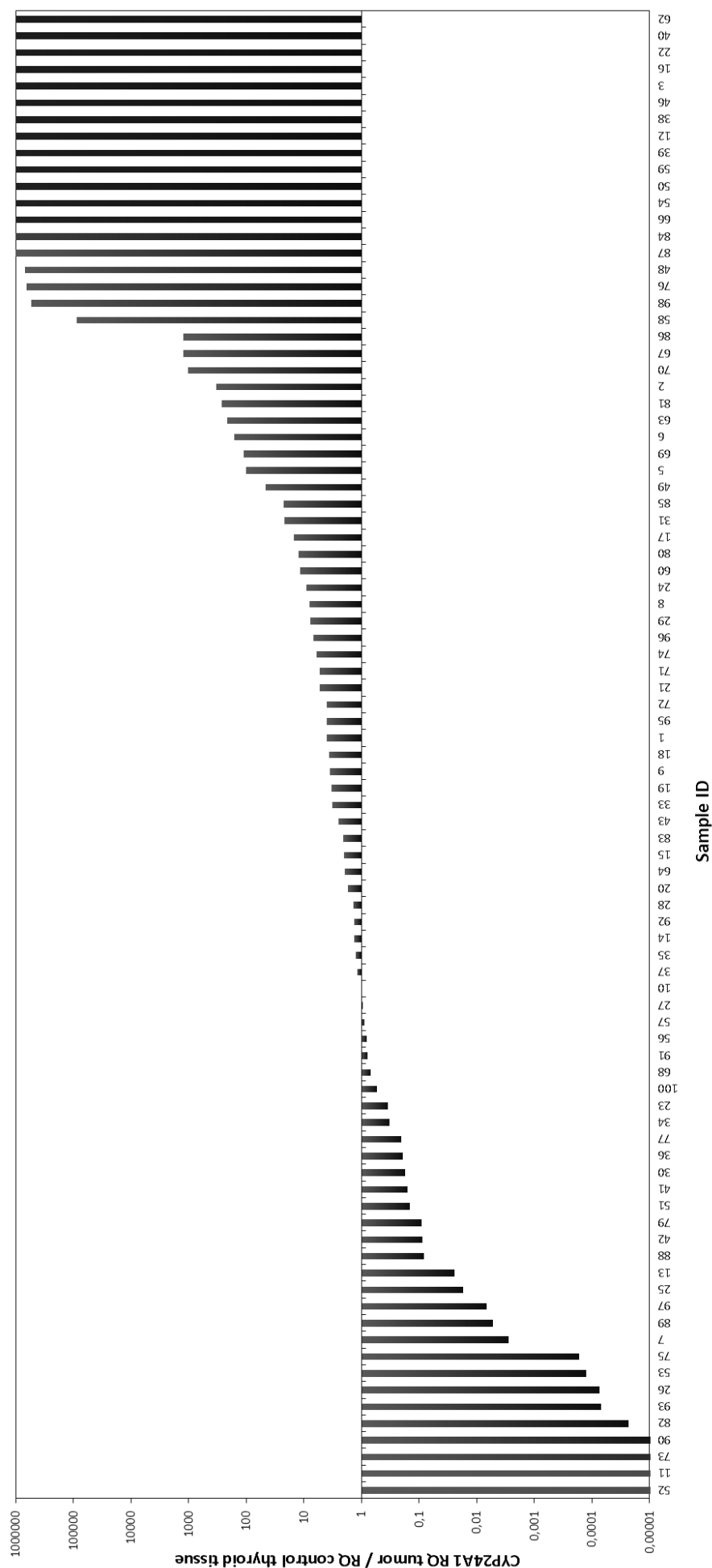


13. ábra A formalinban fixált és paraffinba ágyazott (FFPE), valamint a frissen fagyasztott (FFS) tumor minták CYP24A1 expressziójának összehasonlítása a saját kontrolljaikkal ($p=0,37$ és $p=0,27$)

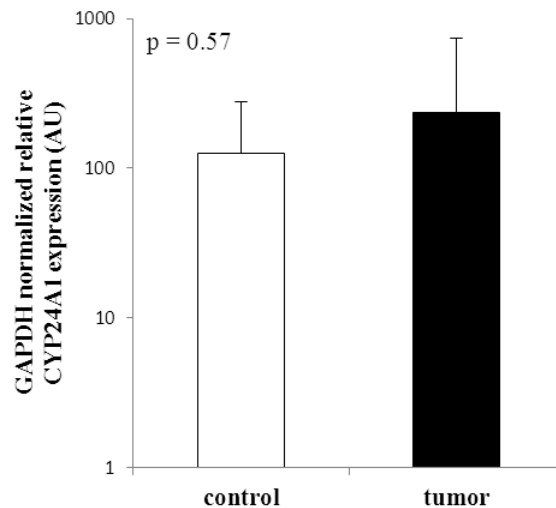
A vizsgált betegek 31%-ának volt más pajzsmirigy betegsége (thyreoiditis, hyperthyreosis, hypothyreosis) a PTC-vel parallel módon, ezért ezen minták kontroll szövetei nem tekinthetők teljesen egészséges kontrollnak. Azonban nem volt szignifikáns különbség a GAPDH-val normalizált CYP24A1 génexpressziós szintekben az tumor mentes (PTC + társbetegség) és a teljesen egészséges kontrolszövetek közt (dCt: 11.00 vs. 8.33, ill. $p = 0.13$).

Megnéztük minden egyes tumor CYP24A1 expressziós szintjét az egészséges kontrollal normalizálva, amit hullámdiagramon ábrázoltunk. Az expresszió mértékét nem befolyásolta a betegek neme ($r=0,019$) és a PTC diagnóziskori életkor ($p=0,97$) (14. ábra).

14. ábra A CYP24A1 expressziós mintázat PTC-s tumorokban az egészséges mintapárral normalizálva. A függőleges tengelyen az emelkedés csökkenés mértéke látható.



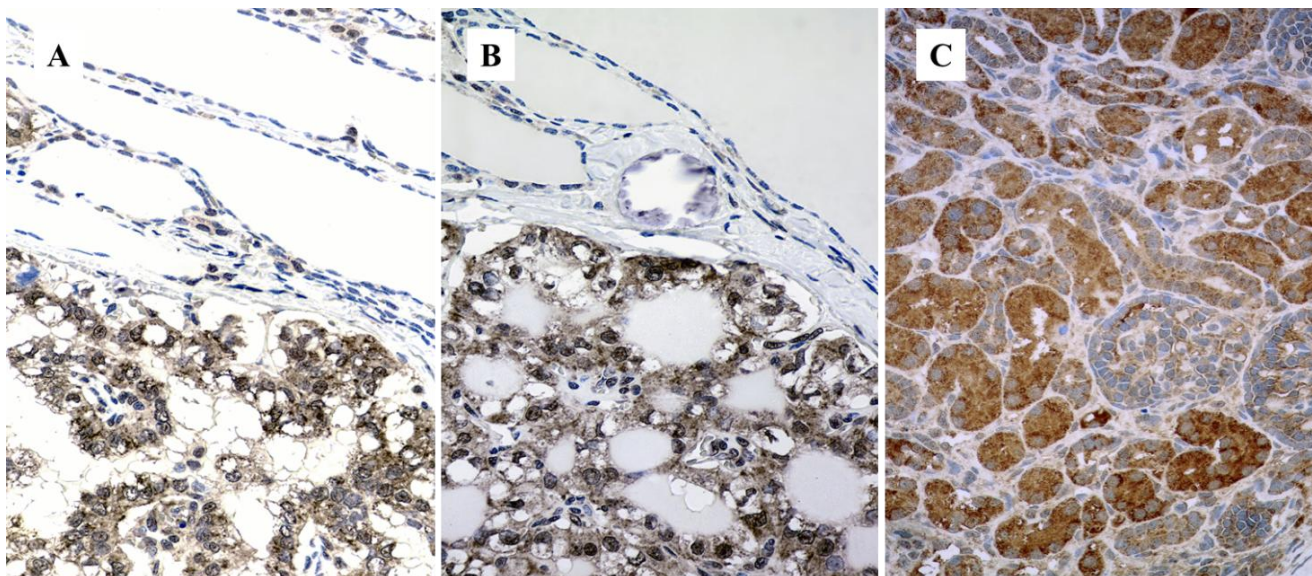
Nem volt szignifikáns összefüggés a CYP27B1 gén expressziójában a tumor minták és kontroll párjaik közt. A minták több mint 90%-ában a CYP27B1 expresszió nem érte el a cutoff értéket, azaz nem nőttek 2-szeresükre vagy nem csökkentek a kontroll minták értékeinek felére. Az átlagos változás $0,88 \pm 0,44$ volt. (15. ábra)



15. ábra A CYP27B1 expressziós változása a kontroll és tumor mintákban a szórással ábrázolva.

A real-time PCR-rel mért CYP24A1 specifikus mRNS fehérje mennyiségi növekedését immunfestéssel is megvizsgáltuk. A festés során is a CYP24A1 fehérjék emelkedett expresszióját tapasztaltuk a tumoros szövetmintákban a tumor melletti, tumor által nem érintett szövetekhez képest (16. ábra). A daganatos szövetrészek struktúráját tekintve diffúz citoplazmatikus szemcsék és erősen festődő sejtmagok láthatóak, míg az ép szövetrészben normál follicularis epithelre jellemző szerkezetet tapasztaltunk CYP24A1 festődés nélkül. Azon mintákban, amelyekben a korábbi vizsgálatok nem mutattak változást vagy épp csökkent CYP24A1 expressziót mértünk, ott az immunfestés során egyáltalán nem mutatkozott elszíneződés.

Az immunhisztokémiai vizsgálatok eredményei egy az egyben megerősítették a real-time PCR által kapott eredményeket, emelkedett CYP24A1 expresszióhoz mindig emelkedett fehérjekifejeződés párosult.



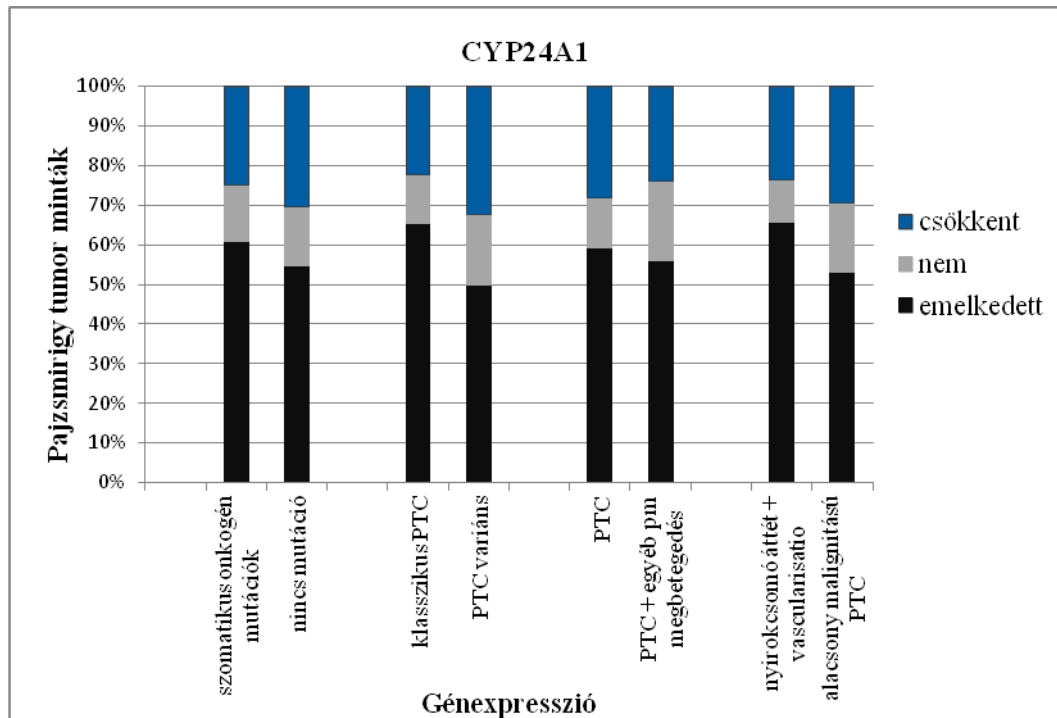
16. ábra Az A és B képen jól látható, hogy a tumor által nem érintett, környéki folliculusok (a szöveti képek felső részén) nem festődtek. Az alsó félben lévő tumoros részlet erősen pozitív festődést mutat a citoplazmatikus granulómákkal, ill. a sejtmagi festődéssel. (400x-os nagyítás) A harmadik, C képen pedig egy egészséges veseszövet festett képe látszik, amelyet kontrollként használtunk a vizsgálataink során. A sejtmagokat hematoxylinnal (kék) festettük, hogy jobban látszódnak.

A PTC minták 4 funkcionális és patológiás alcsoportjának vizsgálata

A CYP24A1 expresszió tekintetében emelkedő tendenciát figyeltünk meg a PTC altípusaival összefüggésben, ellenben a statisztikai analízis (Khi-négyzet teszt) nem erősítette ezt meg (17. ábra), szignifikáns változásokat nem kaptunk, de a következő trendeket figyeltük meg:

Magasabb CYP24A1 expresszió volt megfigyelhető, ha a tumorszövet szomatikus onkogén mutációt hordozott (60,7% vs. 54,5%). A CYP24A1 expresszió emelkedését tapasztaltunk a klasszikus PTC-s mintákban a PTC variánsokhoz képest (65,3% vs. 50,0%). Ha azon PTC-s eseteket, ahol nem volt társbetegség, hasonlítjuk össze azon esetekkel, ahol pajzsmirigy egyéb megbetegedése is társult, ott a csak PTC-s mintákban mértünk magasabb CYP24A1 kifejeződést (59,4% vs. 56,0%).

Végezetül a CYP24A1 overexpresszió jelenléte azon PTC mintákra volt jellemző, ahol nyirokcsomó áttét és/vagy érbetörés volt megfigyelhető (65,7% vs. 52,9%).

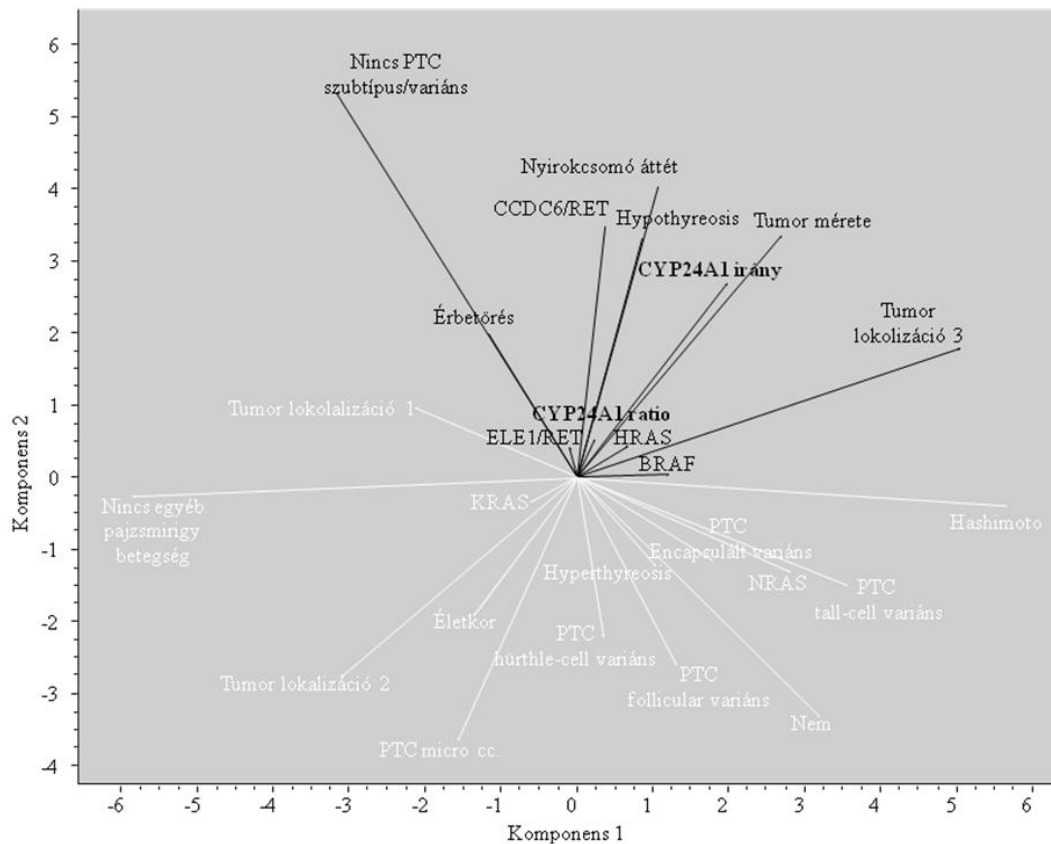


17. ábra A CYP24A1 mRNS expressziós szintjei a 4 funkcionális és patológiás PTC alcsoportban. Az alacsony malignitású PTC-ket McLeod és munkatársai [73] által közölt kritériumrendszer alapján határoztuk meg.

A CYP24A1 expresszió többváltozós PCA analízise és egyéb beteg/tumor jellemzők

A PCA diagram 26 általunk vizsgált paraméter (demográfiai, klinikai, hisztológiai és genetikai) változásait és összefüggéseit mutatja 89 PTC-s mintára vonatkoztatva (18. ábra). Az első két eigenvektor 10,4% és 9% az összes változóra.

Pozitív korrelációt mutat a CYP24A1 expressziós ráta (CYP24A1 irány) és a tumor malignitására vonatkozó változók (érbetörés, nyirokcsomó áttét, tumor mérete), valamint a hypothyreosis, amit a 2. komponens szemléltet. Ezen változókkal negatívan korrelált a páciensek életkora és a papillaris tumorok egyik altípusa, a microcarcinoma. A tumor lokalizációja (tumor lokalizáció 3=mindkét lebenyben) pozitív kapcsolatot mutat a tumor méretével. A genetikai eltérések közül a HRAS, KRAS és RET/PTC3 esetszáma alacsony volt, ennek következtében a változójuk a centrumhoz nagyon közel helyezkedik el, így ebben a modellben nincs jelentőségük. A tumor specifikus CYP24A1 mRNS relatív mennyisége a saját kontroll szövet értékével normalizálva (CYP24A1 ratio) kevésbé befolyásolja az vektorok szerkezetét és irányát.



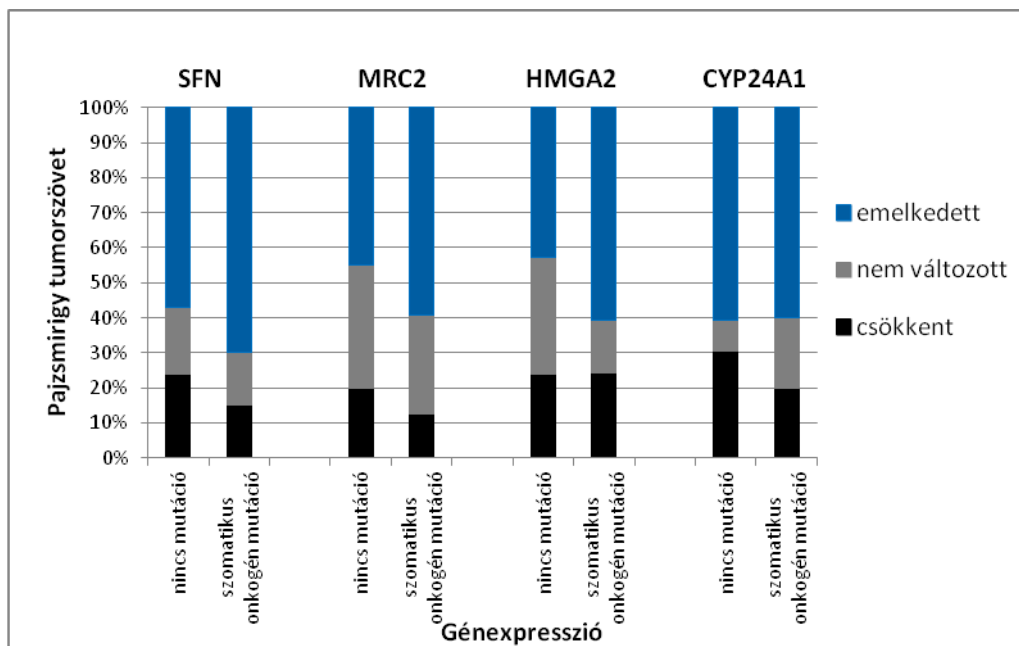
18. ábra PCA főkomponens analízis a CYP24A1 expresszió vonatkozásában, ahol komponens 1 és komponens 2 közötti összefüggéseket ábrázoltuk.

A PCA analízis ábráján a változók láthatók. Minden változót egy egyenes képvisel, amelyek közül feketével jelöltük a kevesebb mint 90 fokos szöget bezárókat. Ez azért jelentős, mert a PCA analízis definíciója alapján azon vonalak, amelyek 90 fokos vagy annál kisebb szöget zárnak be a vizsgált fő változóval, azok korrelációt mutatnak vagy épp függő változók. Jelen esetben a fekete és fehér színekkel különböztettük meg a függő/korreláló, ill. független/nem korreláló változókat a CYP24A1 expresszió vonatkozásában. Jelentős pozitív korreláció látható a CYP24A1 expressziós emelkedés (CYP24A1 irány) és a tumorok malignitásával összefüggésben álló változók csoportja közt (nyirokcsomó áttét, tumor mérete, érбетörés), valamint kismértékű összefüggés mutatkozik a különböző szomatikus onkogén mutációkkal (BRAF, HRAS, RET/ELE1).

A PTC-s csoportba csak azon minták kerültek be, amelyek klasszikus papillaris carcinomák és nem volt semmilyen pajzsmirigyet érintő társbetegség az anamnézisben.

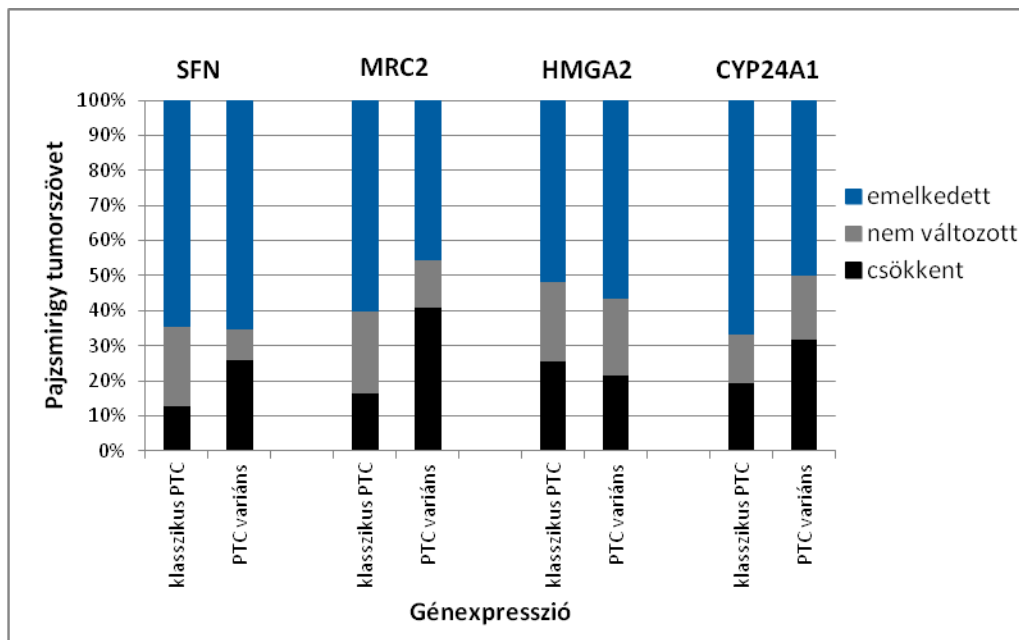
4.7. A SFN, MRC2, HMGA2 génexpresszió és CYP2A1 génexpresszió összehasonlítása hazai papillaris pajzsmirigy tumor mintákon

1. csoport: Ebben a csoportban a szomatikus onkogén mutációt (BRAF, NRAS, HRAS, KRAS és RET/PTC génátrendeződés) hordozó és mutációt nem tartalmazó minták expresszióját hasonlítottuk össze. A CYP24A1 gén esetében nem volt jelentős változás a két csoport között, a „3 gén-modell” expressziója enyhe növekedést mutatott az onkogén mutációt hordozó minták esetében (19. ábra).



19. ábra A tumor minták százalékos megoszlása a „3 gén-modell” és a CYP24A1 gén expressziójának mértékében a szomatikus onkogén mutációt hordozó papillaris carcinomák és mutációt nem hordozó PTC-k csoportja között (1. csoport)

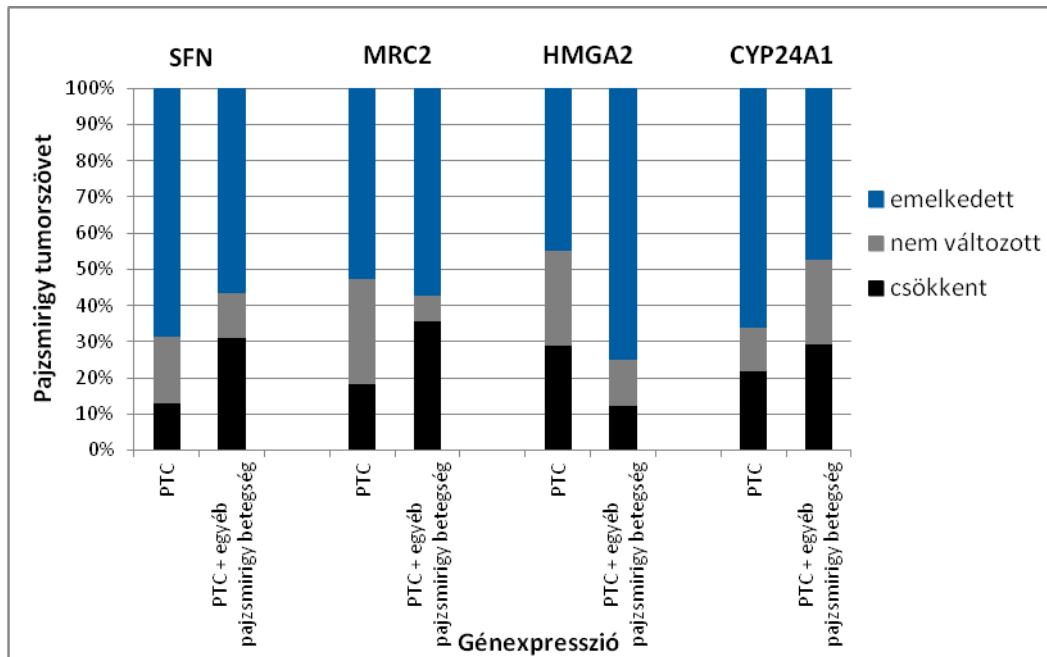
2. csoport: A „3gén-modell” expressziós változását hasonlítottuk össze a papillaris carcinoma különböző altípusai/variánsai (follicularis, Hürthle-sejtes, tall cell, encapsulált és microcarcinoma) vs. klasszikus PTC között. Az expressziós eredmények szignifikáns változás nem mutattak, az MRC2 gén (60,0% vs. 45.5%) és a CYP24A1 gén (66,7% vs. 50,0%), ahol emelkedett expresszió jelentkezett a klasszikus PTC csoportban. A többi génnél az emelkedett tendencia a PTC variánsok között figyelhető meg (SFN (65,2% vs. 64,5%) és HMGA2 (56,5% vs. 51,6%) (20. ábra).



20. ábra A tumorminták százalékos megoszlása a „3 gén-modell” és a CYP24A1 gén expressziójának mértékében a klasszikus papillaris carcinomák és a PTC variánsai között (2. csoport)

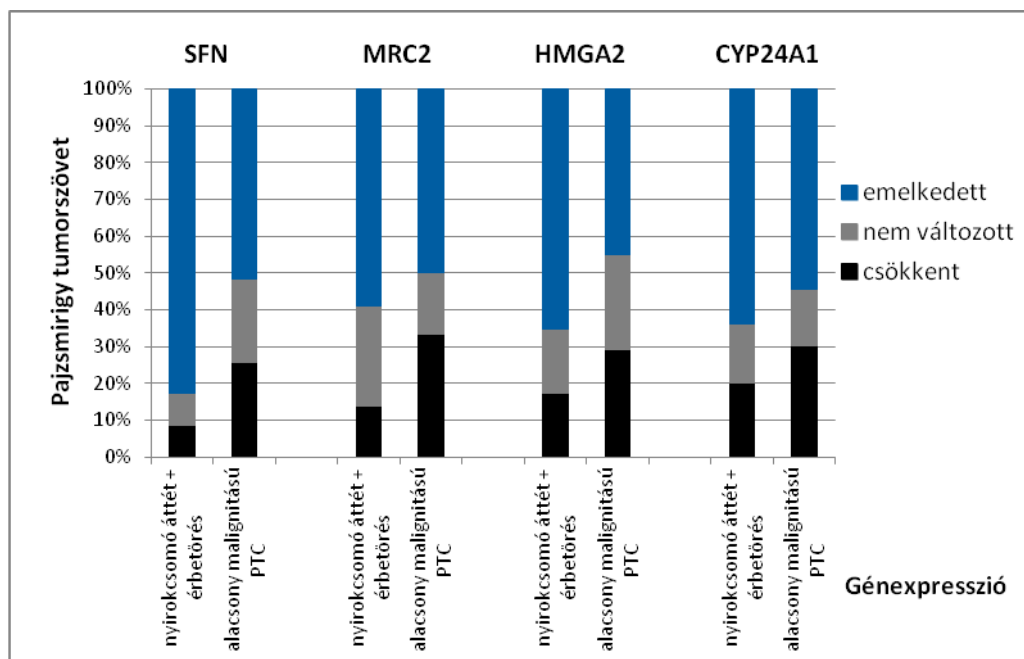
3. csoport: A papillaris carcinomán kívül még egyéb pajzsmirigy betegséggel bíró (Hashimoto-thyreoiditis, hypothyreosis, hyperthyreosis), illetve a csak PTC-s betegek expressziós eredményeit hasonlítottuk össze. A HMGA2 (75,0% vs. 44,7%) és MRC2 (57,1% vs. 52,6%) gének esetében szignifikáns változást nem, ugyanakkor emelkedő trendet lehetett megfigyelni a pluszban még valamilyen pajzsmirigy betegséggel rendelkező betegeknél, ellenben az SFN (68,4% vs.

56,3%) és CYP24A1 (65,8% vs. 47,0%) génekkal, ahol a csak PTC-s eseteknél volt megfigyelhető ez a nem szignifikáns, növekvő változás. (21. ábra)



21. ábra A tumorminták százalékos megoszlása a „3 gén-modell” és a CYP24A1 gén expressziójának mértékében a csak papillaris carcinomás és PTC + egyéb pajzsmirigybetegekben szenvedő betegek csoportja között (3. csoport)

4. csoport: Összevetettük az agresszívabb tulajdonságokkal rendelkező és a kevésbé malignus minták expressziós mintázatait. Az alacsony malignitású PTC-eket McLeod és munkatársai által közölt kritériumrendszer alapján határoztuk meg [73]. Agresszív tulajdonságúak közé soroltuk a nyirokcsomó áttétet és vascularis invasiót/érbetörést mutató tumorokat. Minden más tumor az alacsonyabb agresszivitású, kevésbé malignus csoportba került. Megfigyelhető változások szignifikáns különbséget nem mutattak. Az SFN gén (82,6% vs. 51,6%) expressziója jelentősen, a HMGA2 (65,2% vs. 45,2%) és CYP24A1 (64,0% vs. 54,5%) gének expressziója kissé volt emelkedett a rosszabb prognózisú daganatok esetében, szemben az alacsonyabb malignitásfokú tumorok csökkent expressziójával, amely mindegyik csoportra igaz volt. (22. ábra)



22. ábra A tumorminták százalékos megoszlása a „3 gén-modell” és a CYP24A1 gén expressziójának mértékében az agresszívabb (nyirokcsomó áttét és/vagy érbetörés) kórképű és alacsony malignitású papillaris carcinomák csoportja között (4. csoport).

5. MEGBESZÉLÉS

A pajzsmirigy betegek száma jelentősen megemelkedett az elmúlt évtizedek során. Ennek hátterében több tényező is állhat. A környezeti faktorok közül a pajzsmirigy daganatok vonatkozásában az egyik legjelentősebb a jódeellátottság. Hazánkban az ivóvizek jódtartalma jelentősen alacsony, az ország 80%-ában 25 ug/l koncentrációnál is alacsonyabb a fellelhető jód mennyisége. Ezekkel az adatokkal átfedésben van, hogy a golyvagyakoriság hazánkban meghaladja a WHO által javasolt határértéket (5% az adott populációra nézve), így hazánk jódhiányosnak minősíthető. Magyarországon a 20. század közepétől szorgalmazták a hiányos területeken a jódozott só fogyasztását (8. táblázat). Ez a kezdeményezés egészen a 70-es évekig tartott, amikor a lelkesedés alább hagyott és egyre többen tértek át más sófajtákra. Ezen adatokat a mindennapokra vetítve jelentős következményeket vonnak maguk után a csökkent pajzsmirigyműködésen és kognitív zavarokon túl a pajzsmirigy állománya felszaporodik (golyva, strúma), amely a daganatok kialakulásában is fontos szerepet játszik.

	ug/nap
Csecsemőkor	100
Óvodás kor	70-100
Iskolás kor	90-150
Felnőtt kor	150
Terhes nők	220
Szoptató nők	290

8. táblázat: A napi ajánlott jódbevitel mennyisége korosztályokra lebontva. Forrás:

WHO

A környezeti hatások mellett jelenős szerepet játszik a rutin diagnosztikai módszerek rohamos fejlődése a diagnosztizált pajzsmirigy betegségek számának növekedésében. Ennek köszönhetően sokkal pontosabb és átfogóbb képet kap a vizsgáló orvos. A pajzsmirigy ultrahangos vizsgálatának köszönhetően a pajzsmirigy göbök diagnosztikája is sokkal kifinomultabbá vált, így nemcsak a betegség feltárásában, hanem a diagnózis megalkotásában is jelentős szerepet játszik, hiszen a diagnosztikai

szempontból kérdéses göbök citológiai mintavételét ultrahang vezérelt vékonytű-biopsziával végzik.

Az egészségügyi kiadások oldaláról tekintve is jelentős megtakarítást eredményezhet egy pontosabb és optimálisabb vizsgáló eljárás, ami a felesleges műtétek számát, a felmerülő egészségügyi költségeket és a betegek terheit egyaránt csökkenti. A rutin citológiai vizsgálatok eredményein egy rés mutatkozik, ugyanis kb. 20%-uk [74] kérdéses a diagnózis szempontjából, ezáltal a beteg sorsa is bizonytalanná válik.

A genetikai kutatásoknak és a jelátviteli útvonalanalíziseknek köszönhetően megnőtt a lehetséges kutatási célpontok száma az elmúlt 5-10 év során. Többek között sikerült közelebbről megismerni a MAP-kináz/AKT útvonalat, amely fontos szerepet tölt be a pajzsmirigy carcinogenesisben. Mindezek mellett a gyógyszerkutatás is jelentős potenciált talált a számtalan lehetséges célpontban a gyógyszeres terápia megvalósításához [40].

A diagnosztikus molekuláris markerek közül a BRAF és RAS-család mutációit, valamint a RET/PTC és PAX8/PPARgamma génátrendeződéseket hozták kapcsolatba a pajzsmirigy tumorokkal [12, 30, 32, 33, 35, 36, 55, 72]. Ezen mutációk jelentős hatással bírnak a carcinogenesisre, ill. a betegség klinikai megjelenésére is (pl. a daganat típusa és agresszivitása). A tudományos közleményekben jelentős ellentmondás mutatkozik az ok-okozati kapcsolat vonatkozásában, vagyis, hogy a mutációk lehetnek hatással a carcinogenesisre, vagy épp e folyamat során alakulnak ki [75].

Hazánkban elsőként vizsgáltuk a molekuláris markerek előfordulását differenciált pajzsmirigyrákokon nagyszámú beteg populáción.

A citológiai diagnózisok bizonytalanságát például a molekuláris biológia adta lehetőségekkel, azaz a szomatikus onkogén mutációk és génátrendeződések feltérképezésével lehet lecsökkenteni [72, 74]. Egyes vizsgálatok szerint a genetikai teszttel kiegészített citológiai vizsgálat érzékenysége 80%-ra és specificitása akár 100%-ra is növelhető (pozitív prediktív érték 100%, negatív prediktív érték 89,4%) [74].

Magyarországon a pajzsmirigy daganatok megjelenése pár kivétellel a nemzetközi trendek szerint alakul, így a papillaris carcinoma fordul elő leggyakrabban. A PTC-ben legnagyobb számban a BRAF mutáció jelenik meg, amelyet a RAS géncsalád mutációi

és a RET/PTC génátrendeződés követ [75, 76]. A BRAF mutáció jelenléte preoperatív mintákban az eddigi vizsgálatok tapasztalatai alapján a negatívabb kimenettel párosul, ezért jóval agresszívabb műtéti eljárás javasolt [43, 77, 78]. A BRAF mutáció előfordulása PTC-ben az irodalmi adatok alapján 40-45%-ra tehető [76, 79, 80].

5.1. Szomatikus onkogén BRAF mutáció vizsgálata hazai differenciált pajzsmirigy tumor mintákon

Az általunk elvégzett vizsgálatok alapján a nemzetközi adatokhoz hasonló eredményt kaptunk a PTC-s szöveteket illetően, míg a daganat által nem érintett, ép szövetben nem sikerült kimutatnunk genetikai elváltozást. Bersntein és munkatársaihoz hasonlóan [34], akik 27 magas sejtes variánsú PTC mintából 25-ben detektálták a BRAF mutációt, a mi is magasabb arányban mértünk (5/7), de szignifikáns összefüggést nem tudtunk kimutatni az alacsony mintaszám miatt. Érdekes megfigyelés volt az is, hogy kettő magas sejtes variánsú papillaris carcinoma is hordozta egyszerre a BRAF és NRAS mutációt.

A papillaris microcarcinomákban is találtunk BRAF mutációt (7/19), amely megjelenési arányait tekintve hasonlóan alakult Zheng és munkatársai [36] által elvégzett vizsgálathoz, amelyben 977 daganat vizsgálata során 40,1%-os gyakoriságot állapítottak meg. A microcarcinomák BRAF pozitivitását Bernsteinék által végzett vizsgálatok is megerősítették, ők 83,3%-os előfordulási arányt tudtak kimutatni [34].

Az elsők között megjelent irodalmi adatok jelentős összefüggésről számoltak be a BRAF mutáció jelenléte és a PTC súlyossága között [38-43], de egyre több cikk jelenik meg, amelyben arról írnak a kutatók, hogy nincs összefüggés a daganat agresszivitása, metastatizáló képessége és a BRAF mutáció hordozása között [39, 44-50]. A mi adataink is ezt az utóbbi álláspontot erősítik, ugyanis nem találtunk szignifikáns összefüggést a daganat viselkedése és a BRAF mutáció jelenléte között.

A BRAF mutációval kapcsolatban sokáig az volt a megállapítás, hogy csak a papillaris carcinomában fordul elő. Ezzel szemben négy follicularis carcinoma mintában sikerült BRAF mutációt detektálni (19,1%), így Pennelli és munkatársai eredményeit mi is meg tudtuk erősíteni [32], akik egy FTC-s esetben találtak ilyen mutációt.

5.2. Szomatikus onkogén RAS géncsalád (NRAS, HRAS, KRAS) mutációinak vizsgálata hazai differenciált pajzsmirigy tumor mintákon

A nagyszámú nemzetközi irodalmi adatok alapján egyértelmű tény, hogy a RAS mutációk a follicularis carcinomákra jellemzőek, gyakrabban fordulnak elő, mint a papillaris carcinomákban. PTC típuson belül inkább a follicularis variánsban vagy az encapsulált típusban jelennek meg [76]. A RAS mutációk gyakorisága a PTC-ben 0 és 16% közé esik az irodalmi adatok alapján [81]. A magyar mintákban nem tudtunk ennél magasabb mutációs arányt kimutatni (4,1%), sőt mindez jóval az amerikai adatok (10-20%) alatt maradt [33, 72]. Az is érdekes megfigyelés, hogy más európai országban is alacsonyabb ezen mutációk előfordulási gyakorisága az amerikai átlagnál. Di Cristofaro és munkatársai [81, 82] egyáltalán nem találtak RAS mutációt francia PTC-s mintákban.

5.3. Szomatikus onkogén RET/PTC génátrendeződések vizsgálata hazai differenciált pajzsmirigy tumor mintákon

Munkacsoportunk vizsgálatai során a RET/PTC génátrendeződést is jóval alacsonyabb gyakorisággal tudtuk kimutatni a nemzetközi adatokhoz képest. A nemzetközi adatok 10-40%-os gyakoriságot mutatnak [80, 83], ezzel szemben a hazai PTC-s mintákban csupán 5,1%-os frekvenciát sikerült mérnünk. Összefüggést nem találtunk a betegség kimenetele és a génátrendeződés jelenléte között. Az irodalmi adatok alapján a RET/PTC3 génátrendeződés a papillaris carcinomák közül is a jóval agresszívabb tulajdonságú változattal hozható összefüggésbe [23, 33, 37, 47, 80], ezáltal ez egy erős negatív prognosztikus érték. Érdekes megfigyelést tettek Leeman-Neill és munkatársai [84], amikor is 62 csernobili atomkatasztrófa utáni papillaris carcinomas mintát vizsgáltak meg és az európai átlagnál jóval magasabb arányban (35%) találtak RET/PTC3 átrendeződést a daganatos mintákban.

5.4. Szomatikus onkogén PAX8/PPARgamma géátrendeződések vizsgálata hazai differenciált pajzsmirigy tumor mintákon

Nagy meglepetést okozott a vizsgálataink során, hogy PAX8/PPARgamma génátrendeződést egyáltalán nem találtunk sem a papillaris carcinomas, sem a follicularis carcinomas mintákban. Módszerünket Németországból kapott, ismert génátrendeződést hordozó mintákkal validáltuk. Ezzel kizártuk, hogy a meglepő eredményünk a módszerünk hibájából fakadt volna. Irodalmi adatok alapján a

PAX8/PPARgamma génátrendeződés a follicularis carcinomákban igen magas arányban (30-40%) fordul elő [85]. A vizsgált génátrendeződés gyakorisága vitatott a PTC-s mintákban, ugyanis Armstrong és munkatársai [86] a follicularis variánsú PTC-ben alacsonyabb gyakorisággal (1-5%) írják le, ezzel szemben jóval magasabb megjelenésről (37%) számoltak be Castro és munkatársai [87], akik szintén a follicularis variánsokat vizsgálták. Míg Klemke és munkatársai [88] egyáltalán nem találtak ebben az altípusban PAX8/PPARgamma génátrendeződést. Eszlinger munkatársaival [74] 310 dániai FNAB mintát vizsgáltak meg, amelyekben szintén alacsony előfordulást mutatott (8 eset) a PAX8/PPARgamma átrendeződés. A megtalált génátrendeződéseknek csak a fele volt ténylegesen összefüggésben valamely tumorról Eszlingerék vizsgálatában. Egy másik vizsgálatuk során, amikor 33 tumor párt vizsgáltak, mindössze egy PAX8/PPARgamma átrendeződést sikerült detektálniuk [46].

5.5. A SFN, MRC2, HMGA2 génexpresszió összehasonlítása hazai papillaris pajzsmirigy tumor mintákon

Egy genom screening eredménye alapján 3, egymástól teljesen más független, más géncsaládba tartozó és funkciót ellátó gén kombinációja bizonyult a legpontosabb predikciós faktornak a pajzsmirigy daganatok esetében. Ez a három gén az SFN, MRC2 és HMGA2. A vizsgálatok során kapott eredmények igen szembetűnőek, amit a statisztikai analízisek után kapott szenzitivitás (80%) és specificitás (100%) értékek is jeleznek [58].

Az általunk elvégzett vizsgálatok statisztikailag szignifikáns összefüggéseket nem mutattak, de megerősítette azt a feltételezést, hogy ezen gének expresszióbeli változásának szerepe lehet a pajzsmirigy daganatok kialakulásában.

5.6. A CYP24A1 és CYP27B1 gén expressziójának vizsgálata papillaris pajzsmirigy tumor mintákon

A CYP24A1 gén expressziós vizsgálatát papillaris carcinoma mintákon elsőként mi végeztük el [89, 90]. Összesen 100 mintát/ép vizsgáltunk, amelyeknek hisztológiai, klinikai adatit is összegyűjtöttük. A vizsgálat lényege és újdonsága az volt, hogy a tumoros szövetminták CYP24A1 gén expressziójának mértékét a beteg saját, ép

szövetpárjához viszonyítottuk. A CYP24A1 és CYP27B1 génexpressziók mellett a mintákban megvizsgáltuk a szomatikus onkogén mutációk (BRAF, NRAS, HRAS és KRAS gének, valamint a RET/PTC1 és RET/PTC3 génátrendeződés) jelenlétét is. A kapott eredményeket összevetettük a klinikai és szövettani adatokkal. A CYP24A1 gén emelkedett expresszióját tapasztaltunk a PTC minták több mint felében. Az immunhisztokémiai eredmények egyhangúan alátámasztották a mennyiségi real-time PCR során kapott eredményeket. Méréseink során az is megfigyelhető volt, hogy a CYP24A1 fehérje expressziója emelkedést mutatott a tumoros mintákban a kontroll (egészséges) párhoz képest.

Az összes adat tekintetében egyfajta trend figyelhető meg a PTC patológiai státusza és a CYP24A1 gén expressziós mintázata között.

Eddig még nem vizsgálták a D-vitamin szerepét pajzsmirigy daganatok kialakulásában, így fenn áll az a kérdés, hogy a korábban más daganatoknál feltárt védő hatás itt is jelentkezik-e [70].

A papillaris tumoros minták jelentős részében emelkedett a CYP24A1 gén expresszió, amit az immunhisztokémiai vizsgálatok is megerősítettek. Mindezek alapján megállapíthatjuk, hogy a CYP24A1 gén tumorszövetekbeli emelkedett expressziója a D-vitamin jól ismert védő hatása ellen alakulhat ki. Shama és munkatársai ugyanilyen megfigyelésre jutottak az emelkedett CYP24A1 expresszió tekintetében, amikor pajzsmirigy tumor sejtvonalakon végezték vizsgálataikat [91]. Clinkspoor és munkatársai alacsonyabb mintaszámon (n=38), de már differenciált pajzsmirigy daganat szövetekben vizsgálták a CYP24A1 fehérje expressziós viselkedését [92]. Vegyesen vizsgáltak follicularis (n=18) és papillaris (n=20) carcinomas mintákat és – velünk ellentétben – nem használtak saját szöveti kontrollt. Az előző két vizsgálat alapján elmondhatjuk, hogy a mi eredményeink erősebb alapon helyezkednek el, hiszen nagyobb mintaszámon dolgoztunk és ugyanazon beteg tumor mentes szöveti pajzsmirigy párját is megvizsgáltuk.

Ha a genetikai adatokat összevetjük a klinikai és hisztológiai információkkal, akkor kiderül, hogy a CYP24A1 mRNS expresszió emelkedése figyelhető meg, ha a betegnek még környékbeli nyirokcsomó áttéte volt vagy a tumor érbetöréssel rendelkezett szemben az alacsony malignitású mintákkal (65,7% vs. 52,9%). Ezzel szemben hasonló vizsgálat során teljesen ellentmondó eredményt kaptak Clinkspoor és munkatársai,

ugyanis ők alacsonyabb CYP24A1 expressziót mértek az N1-es típusú (nyirokcsomó metastasist mutató) PTC szövetekben az N0 státuszú (áttétet nem mutató) PTC szövetekhez képest (11% vs. 18% arányban) [93]. De sajnos az eredményeik statisztikailag nem voltak szignifikánsak.

Az, hogy a papillaris pajzsmirigy rákokra bizonyos genetikai elváltozások jellemzőek (BRAF, RAS, RET), már evidenciákon alapul [94]. Megvizsgáltuk a CYP24A1 gén expresszió kapcsolatát a genetikai markerekkel és a PTC-s mintáink szövettani paramétereivel. Ehhez PCA többváltozós analízist használtunk. Ezt a módszert széles körben használják az orvosi biológiai problémák és kérdések megoldásában, beleértve az expressziós adatok elemzését is. A PCA módszer előnye, hogy a kétdimenziós ábrázolásokhoz képest sokkal jobban tükrözi a vizsgált változók közti kapcsolatot. A két komponens kumulatív varianciája nem haladta meg a 20%-ot, ez azt is sugallja, hogy az adatok által kapott szerkezeti háló csak gyengén magyarázható ezen komponensek mentén. Ennek ellenére néhány adat közti összefüggés ránézésre is nyilvánvaló. Például a CYP24A1 emelkedett expresszió (CYP24 irány) és néhány malignus faktor közt pozitív korreláció mutatkozott. A kapott adatok alapján biztos, messzemenő következtetéseket nem lehet levonni, mert az adatok egyenetlensége még egy további komponens bevezetését igényelheti.

Khadzkou és munkatársai [71] a PTC-s szövetekben vizsgálták a CYP27B1, azaz az 1-alfa-hidroxiláz, expressziót és emelkedést tapasztaltak a normál szövetekben mért expressziós változáshoz képest, de a különbség nem volt statisztikailag szignifikáns. Ennek az alacsony mintaszám lehetett az egyik oka (16 PTC, 7 metastatizáló PTC és 5 kontroll). Sharma és munkatársai in vivo PTC vizsgálatok során hozzánk hasonló eredményt kaptak a CYP27B1 expressziós mintázattal kapcsolatban, azaz nem változik az enzim szintje a calcitriol hatására a differenciált pajzsmirigy daganatos sejtvonalakban [91].

5.7. A SFN, MRC2, HMGA2 génexpresszió és CYP24A1 génexpresszió összehasonlítása hazai papillaris pajzsmirigy tumor mintákon

A korábban már leírt genom screenig során 3 gén (SFN, MRC2 és HMGA2) expressziós mintázatát mi is megvizsgáltuk. Kutatásaink során ezeket az adatokat összevetettük a D-vitamin anyagcserében szerepet játszó CYP24A1 gén expressziós eredményeivel. Munkacsoportunk által elsőként elvégzett vizsgálatok során kapott

eredmények statisztikailag szignifikáns különbséget nem mutattak, de trendeket, következtetéseket levonhatunk belőlük.

A PTC klasszikus változata és egyéb variánsok (follicularis, Hürthle-sejtes, tall cell, encapsulált és microcarcinoma) tekintetében az MRC2 gén és a CYP24A1 gén emelkedett expressziót mutatott a klasszikus PTC csoportban. Az SFN és HMGA2 gének esetében az emelkedő tendencia a PTC variánsok között figyelhető meg.

Megvizsgáltuk azon eshetőséget is, amikor egyéb pajzsmirigyet érintő társbetegség (Hashimoto-thyreoiditis, hyperthyreosis, hypothyreosis) is jelen volt a tumor mellett. A HMGA2 és MRC2 gének esetében emelkedő trendet láttunk a valamilyen egyéb pajzsmirigy betegséggel rendelkező betegek mintáinál, míg az SFN és a CYP24A1 géneknél pont a másik, a csak PTC-s csoportnál jelentkezett ez az irány. Ez a megfigyelés azért érdekes, mert pl. autoimmun thyreoiditisben nem emelkedik a D-vitamint neutralizáló enzim mennyisége, így a calcitriol immunmoduláló hatása érvényesülhet.

Összevetettük az expressziós mintázatokat az agresszívabb karakterű, illetve érbetörést, metastasis nem mutató tumorok esetében is. Elvárásainknak megfelelően, mind a négy gén emelkedett expressziót mutatott az agresszív csoportban.

Mindezek alapján elmondható, hogy a malignus tulajdonságok jelenléte a vizsgált gének fokozott génexpressziójával párosul, ami például a CYP24A1 esetében a D-vitamin antitumor hatása ellen irányul, a daganat növekedése és fennmaradása érdekében.

A pajzsmirigyet érintő szomatikus onkogén mutációk és génátrendeződések vizsgálata során kapott eredményeink irodalmi adatoktól való különbözősége feltételezéseink szerint kapcsolatban állhat a korábban leírt jódehlátottságbeli különbséggel. A legtöbb publikáció és adat az amerikai kontinensről származik, amely jódban gazdag terület. Ezzel szemben Európa és Magyarország is jódban szegényebb [95-101]. A legújabb eredmények alapján a magas jódbevitel szignifikánsan növeli a BRAF mutáció létrejöttét és emellett pluszban még a pajzsmirigy carcinoma papillaris változatának megjelenését is segíti [79]. A velünk szomszédos Ausztriában az elmúlt 40 év alatti jódpótlás hatására a pajzsmirigy rákok szövettani típusaiban is változás állt be, ugyanis papillaris carcinomák aránya megemelkedett [102]. Ezek is rávilágítanak minket arra, hogy a geológiai eltérések hátterében valamilyen részben a

jódellátottságbeli változások állhatnak [76, 103]. A 90-es években egy korábbi vizsgálatban kanadai és magyar pajzsmirigy rákos minták elemzése során a jódbevitel és a RAS onkogének mutációja közötti összefüggéseket kerestek. A vizsgálat azért volt érdekes, mert egy jódban jelentősen gazdag területet (Kanada) hasonlítottak össze egy jelentősen jódhiányos területtel. Az eredmények értékelése során egyetlen egy RAS mutációt sem tudtak kimutatni a 22 hazai PTC-s mintából [98]. Egy másik vizsgálat is megerősítette ezeket az eredményeket, amikor is egy szintén alacsony jódellátottságú vidéken, Szerbiában vizsgálták a RAS mutációk arányát és a magyar eredményekhez hasonló eredményeket kaptak [47].

Mindezek alapján nyilvánvalóvá válik, hogy a differenciált pajzsmirigy carcinomák számos molekuláris, klinikai és patológiai tulajdonsága megváltozott az elmúlt évtizedek során [76]. Ez részben köszönhető a technikai háttér fejlődésének, valamint még érdemes megemlíteni a helyi változatosságokat is, mint például a bevitt jód mennyisége, amely jelentősen átválthatja a tankönyvi adatokat és a daganatok kialakulását.

6. KÖVETKEZTETÉSEK

Az általunk elvégzett vizsgálatokon keresztül képet kaptunk a hazai pajzsmirigydaganatok genetikai variabilitásáról. Elmondhatjuk, hogy néhány kivétellel Magyarországon is az irodalmi adatoknak megfelelően alakult a mutációk és génátrendeződések aránya. A RAS mutációk aránya follicularis carcinomában jóval a nemzetközi szint alatt maradt. A legnagyobb meglepetést az adta, hogy hazánkban egyáltalán nem jellemző a PAX/PPARgamma génátrendeződés a follicularis pajzsmirigyrákokban. Ezen eltérések pontos okát nem tudjuk, de feltételezéseink szerint a jódeellátottsággal lehetnek összefüggésben.

Továbbá a komplex génexpressziós vizsgálatok megerősítettek bennünket abban, hogy a D-vitamin neutralizálásában szerepet játszó CYP24A1 gén emelkedett expressziót mutat agresszívabb (nyirokcsomó áttét, érbetörés) PTC daganatokban és pozitívan korrelál az esetlegesen jelen lévő genetikai mutációkkal, valamint a tumor méretével. A relatív magas mintaszámon végzett vizsgáltunk eredményei alapján a D3-vitamin inaktiválásában szerepet játszó CYP24A1 gén aktivitása jelentősen változik PTC-s mintákban az egészséges kontroll szövet expressziójához képest. A PCA analízis során pozitív korrelációt találtunk a CYP24A1 expressziós arány és a pontmutációk (BRAF, HRAS), génátrendeződések (RET/PTC1) megléte és a tumor negatív tulajdonságai között. Ezek alapján felmerül, hogy a CYP24A1 enzim közvetlenül is részt vehet a pajzsmirigy tumorok kialakulásában.

A differenciált pajzsmirigy daganatok jelentős százalékát teszik ki az összes pajzsmirigyráknak. A genetikai alapkutatásoknak köszönhetően egyre több genetikai tényezőt ismerünk meg a tumor képződés folyamatában. Ezen ismereteink alapját képezhetik új diagnosztikus módszereknek és új gyógyszermolekulák fejlesztésének.

A pajzsmirigy „hideg”-göbök napi diagnosztikáját ellátó ultrahang vezérelt aspirációs citológiai vizsgálatokat célszerű lenne kiegészíteni molekuláris biológiai vizsgálatokkal is. Ez azért lenne fontos, mert a bizonytalan eredmények számát még jobban le lehetne csökkenteni, ill. a már genetikai elváltozásokat mutató, amúgy mikroszkóp alatt egy benignus strúma képét mutató göböt már a daganat manifesztálódása előtt el lehetne távolítani.

Az általunk vizsgált onkogének a MAP-kináz útvonal működésében, ezáltal a sejtek osztódásában, differenciálódásában és apoptózis indukálásban játszanak fontos szerepet.

A munkánk során beállított genetikai módszerek megteremtették az alapját ezen eljárások hazai, rutinszerű bevezetésének. A farmakogenomika rohamos fejlődésének köszönhetően a személyre szabott orvoslás egyre inkább szerepet kap a betegségek, daganatok gyógyításában. Nagy áttörés volt ilyen szempontból például az EGFR-gátló cetuximab bevezetése a metastaticus colon carcinomák kezelésében. A BRAF pozitív melanoma gyógyítására használt BRAF-gátló vemurafenib is ígéretes hatással kecsegtet, ám egyelőre még a pajzsmirigy tumorok nem szerepelnek az indikációs területek között. Az a tény, hogy ismerjük melyik daganat típusra melyik onkogén szomatikus mutáció jellemző, alapjául szolgálhat új gyógyszermolekulák fejlesztésének. Munkánk tükrében érdemes lenne elgondolkodni egy CYP24A1 enzimet gátló vegyület kifejlesztésén, ezáltal lehetőség nyílna a calcitriol antitumor hatását kihasználni.

7. ÖSSZEFOGLALÁS

Az utóbbi évtizedekben a felderített pajzsmirigyrákos megbetegedések száma drámaian megemelkedett. A korai diagnózist lehetővé tevő, ill. a betegség prognózisát befolyásoló paraméterek, elsősorban genetikai eltérések keresése napjainkban jelentős szerepet kap.

Munkacsoportunk célja az volt, hogy megvizsgálja a pajzsmirigydaganatokkal összefüggésben már leírt szomatikus onkogén mutációk (BRAF, NRAS, HRAS, KRAS) és génátrendeződések (RET/PTC és PAX/PPARgamma) arányát hazai differenciált pajzsmirigy tumoros mintákban, valamint a D-vitamin anyagcserében szerepet játszó CYP24A1 és CYP27B1 gének, ill. a „3 gén-modell” (SFN, MRC2, HMGA2) expressziós mintázatát PTC mintákban. A vizsgált genetikai eltérések esetében jelentős összefüggést nem találtunk a betegség agresszivitása és a genetikai eredmények között, amelyet Khi-teszttel elemeztünk. A génexpressziós vizsgálatokhoz 4 csoportra bontottuk a mintáinkat a genetikai, hisztológiai és klinikai adatok alapján. A „3 gén-modell” esetében az expresszió változását a tumoros minták százalékos arányában vizsgáltuk a négy csoportban. A tumor negatív tulajdonságaival, ill. onkogén genetikai változás jelenlétével általában az emelkedett expresszió párosult. Khi-tesztet használtunk a tumor minták eloszlásának vizsgálatához a CYP24A1 expresszió tekintetében, de statisztikailag szignifikáns eredményt nem kaptunk, csak emelkedő/csökkenő trendeket tudtunk megfigyelni. A multivariációs főkomponens analízis során a CYP24A1 gén expressziós változása pozitívan korrelált a tumorok malignitásával összefüggésben álló változók csoportjával.

Adataink azt valószínűsítik, hogy a vizsgált genetikai eltéréseknek szerepe lehet a differenciált pajzsmirigy daganatok kialakulásában, ezáltal ismeretük meghatározó lehet a műtét utáni terápia felállításában. Ezen eredmények alapján a genetikai eltérések vizsgálatának szerepe és helye van a daganatok kialakulása szempontjából jelentős „hideg” göbök rutin citológiai vizsgálatánál, mint predikciós módszer, a göbök malignizálódási hajlamának előrejelzése és a későbbi kezelés céljából (radiojód kezelés, BRAF és NRAS gátló gyógyszerek). Továbbá új gyógyszer-molekulák célpontját képezhetik például a D-vitamin antitumor hatását kihasználó és erősítő CYP24A1 enzimgátlók.

SUMMARY

There was a dramatic increase in diagnosed thyroid cancers in the last decade. The parameters allowing an early detection, like genetic alterations became essential. Our aim here was to test the proportion of somatic oncogene mutations (BRAF, NRAS, KRAS, HRAS) and gene rearrangements (RET/PTC, PAX/PPARgamma) in thyroid gland tumors. We also tested the expression patterns of CYP24A1 and CYP27B1, and the expression patterns of the “3-gene model” (SFN, MRC2, HMGA2) in papillary thyroid carcinomas.

We could not find a statistically significant relationship between the somatic oncogenic mutations, gene rearrangements and the aggressivity of the tumor by Chi-test. We divided our study group into four subgroups based on the clinical and histological properties. In case of the “3-gene model“ we studied the change in expression (increased, decreased, did not change) in the percentage of samples in the four subgroups. Negative outcomes and genetic alterations were usually associated with increased expression. We used Chi-tests to study the change in CYP24A1 expression, but we could not find a significant change, we could only observe some trends. The result of the principal component analysis shows that the change in expression of CYP24A1 is positively correlated with the features associated with malignancy (lymph node metastases, tumor size, vascular infiltration, somatic oncogene mutations and/or gene-rearrangements).

Our data implies that the studied genetic alterations could play a role in tumorigenesis, therefore their detection could influence the post-surgical therapy of patients. Our results further enforce the idea that genetic testing has a place in the routine diagnostics of thyroid gland cold nodules as a predictive method of the nodule's susceptibility to malignant transformation and as a determinant of further therapy (radioiodine therapy, BRAF and NRAS inhibitors). Furthermore CYP24A1 inhibitors could be the next target of anticancer drugs to facilitate the anti-tumor effect of vitamin D.

8. IRODALOMJEGYZÉK

1. *A pajzsmirigy működése.* In: Fonyó A., Ligeti E., Kollai M., Szűcs G. (szerk.), *Az orvosi élettan tankönyve*, Medicina Könyvkiadó Zrt., Budapest, 2008: 487-497.
2. Eszlinger, M., L. Hegedus, and R. Paschke (2014) *Ruling in or ruling out thyroid malignancy by molecular diagnostics of thyroid nodules.* Best Pract Res Clin Endocrinol Metab. **28**(4): p. 545-57.
3. Timár, J., *Pajzsmirigyhormonok és antitireoid anyagok.* In: Gyires K., Fürst Z. (szerk.), *Farmakológia* Medicina Könyvkiadó Zrt., Budapest, 2007.
4. Horvath, E., S. Majlis, R. Rossi, C. Franco, J.P. Niedmann, A. Castro, and M. Dominguez (2009) *An ultrasonogram reporting system for thyroid nodules stratifying cancer risk for clinical management.* J Clin Endocrinol Metab. **94**(5): p. 1748-51.
5. Kwak, J.Y., K.H. Han, J.H. Yoon, H.J. Moon, E.J. Son, S.H. Park, H.K. Jung, J.S. Choi, B.M. Kim, and E.K. Kim (2011) *Thyroid imaging reporting and data system for US features of nodules: a step in establishing better stratification of cancer risk.* Radiology. **260**(3): p. 892-9.
6. Friedrich-Rust, M., G. Meyer, N. Dauth, C. Berner, D. Bogdanou, E. Herrmann, S. Zeuzem, and J. Bojunga (2013) *Interobserver agreement of Thyroid Imaging Reporting and Data System (TIRADS) and strain elastography for the assessment of thyroid nodules.* PLoS One. **8**(10): p. e77927.
7. Russ, G., C. Bigorgne, B. Royer, A. Rouxel, and M. Bienvenu-Perrard (2011) *[The Thyroid Imaging Reporting and Data System (TIRADS) for ultrasound of the thyroid].* J Radiol. **92**(7-8): p. 701-13.
8. Lakatos, P.I. Takács, (szerk.) *Pajzsmirigybetegségek a gyakorlat oldaláról* Semmelweis, Budapest, 2007. 288 p.
9. Albores-Saavedra, J., D.E. Henson, E. Glazer, and A.M. Schwartz (2007) *Changing patterns in the incidence and survival of thyroid cancer with follicular phenotype--papillary, follicular, and anaplastic: a morphological and epidemiological study.* Endocr Pathol. **18**(1): p. 1-7.
10. Pellegriti, G., F. Frasca, C. Regalbuto, S. Squatrito, and R. Vigneri (2013) *Worldwide increasing incidence of thyroid cancer: update on epidemiology and risk factors.* J Cancer Epidemiol. **2013**: p. 965212.
11. Konrady, A. (2008) *Aktualitások a differenciált pajzsmirigyrák felismerésében és kezelésében.* Magyar Orvos. **9**: p. 40-42.
12. Tobias, B., B. Balla, P.J. Kosa, J. Horanyi, I. Takacs, E. Bolony, C. Halaszlaki, Z. Nagy, G. Speer, B. Jaray, E. Szekely, R. Istok, and P. Lakatos (2011) *[Comparative study of somatic oncogene mutations in normal thyroid tissues and thyroid neoplasms].* Orv Hetil. **152**(17): p. 672-7.
13. Leövey, A., V.E. Nagy, G. Paragh, and K. Rác, (szerk.) *Az endokrin- és anyagcserebetegségek gyakorlati kézikönyve.* Medicina Könyvkiadó Zrt., Budapest, 2011.
14. Lloyd, R.V., D. Buehler, and E. Khanafshar (2011) *Papillary thyroid carcinoma variants.* Head Neck Pathol. **5**(1): p. 51-6.
15. Benvenga, S. (2008) *Update on thyroid cancer.* Horm Metab Res. **40**(5): p. 323-8.

16. Schlumberger, M. (2007) *[Papillary and follicular thyroid carcinoma]*. Ann Endocrinol (Paris). **68**(2-3): p. 120-8.
17. Cheng, S.P., C.L. Liu, C.Y. Tzen, T.L. Yang, K.S. Jeng, T.P. Liu, and J.J. Lee (2008) *Characteristics of well-differentiated thyroid cancer associated with multinodular goiter*. Langenbecks Arch Surg. **393**(5): p. 729-32.
18. Bilimoria, K.Y., D.J. Bentrem, C.Y. Ko, A.K. Stewart, D.P. Winchester, M.S. Talamonti, and C. Sturgeon (2007) *Extent of surgery affects survival for papillary thyroid cancer*. Ann Surg. **246**(3): p. 375-81; discussion 381-4.
19. Henderson, Y.C., T.D. Shellenberger, M.D. Williams, A.K. El-Naggar, M.J. Fredrick, K.M. Cieply, and G.L. Clayman (2009) *High rate of BRAF and RET/PTC dual mutations associated with recurrent papillary thyroid carcinoma*. Clin Cancer Res. **15**(2): p. 485-91.
20. Somjen, D., Y. Weisman, F. Kohen, B. Gayer, R. Limor, O. Sharon, N. Jaccard, E. Knoll, and N. Stern (2005) *25-hydroxyvitamin D3-1alpha-hydroxylase is expressed in human vascular smooth muscle cells and is upregulated by parathyroid hormone and estrogenic compounds*. Circulation. **111**(13): p. 1666-71.
21. Tangpricha, V., J.N. Flanagan, L.W. Whitlatch, C.C. Tseng, T.C. Chen, P.R. Holt, M.S. Lipkin, and M.F. Holick (2001) *25-hydroxyvitamin D-1alpha-hydroxylase in normal and malignant colon tissue*. Lancet. **357**(9269): p. 1673-4.
22. Takács, I., I. Benkő, E. Toldy, N. Wikonkál, L. Szekeres, E. Boldolay, E. Kiss, B. Szabó, Z. Valkusz, T. Kovács, A. Szabó, N. Bittner, R.G. Kiss, and P. Lakator (2014) *Második magyarországi konszenzus a D-vitamin szerepéről a betegségek megelőzésében és kezelésében*. Magyar Orvos, (S1): p. 5-26.
23. Szántó, Z.K.I. Zoltán (2008) *A pajzsmirigy cancerogenesisében szereplő oncogének, antioncogének és egyéb tumormarkerek diagnosztikai és prognosztikai jelentősége*. Orvostudományi Értesítő, **81**(1): p. 9-12.
24. Takano, T.N. Amino (2005) *Fetal cell carcinogenesis: a new hypothesis for better understanding of thyroid carcinoma*. Thyroid. **15**(5): p. 432-8.
25. Brose, M.S., P. Volpe, M. Feldman, M. Kumar, I. Rishi, R. Guerrero, E. Einhorn, M. Herlyn, J. Minna, A. Nicholson, J.A. Roth, S.M. Albelda, H. Davies, C. Cox, G. Brignell, P. Stephens, P.A. Futreal, R. Wooster, M.R. Stratton, and B.L. Weber (2002) *BRAF and RAS mutations in human lung cancer and melanoma*. Cancer Res. **62**(23): p. 6997-7000.
26. Davies, H., G.R. Bignell, C. Cox, P. Stephens, S. Edkins, S. Clegg, J. Teague, H. Woffendin, M.J. Garnett, W. Bottomley, N. Davis, E. Dicks, R. Ewing, Y. Floyd, K. Gray, S. Hall, R. Hawes, J. Hughes, V. Kosmidou, A. Menzies, C. Mould, A. Parker, C. Stevens, S. Watt, S. Hooper, R. Wilson, H. Jayatilake, B.A. Gusterson, C. Cooper, J. Shipley, D. Hargrave, K. Pritchard-Jones, N. Maitland, G. Chenevix-Trench, G.J. Riggins, D.D. Bigner, G. Palmieri, A. Cossu, A. Flanagan, A. Nicholson, J.W. Ho, S.Y. Leung, S.T. Yuen, B.L. Weber, H.F. Seigler, T.L. Darrow, H. Paterson, R. Marais, C.J. Marshall, R. Wooster, M.R. Stratton, and P.A. Futreal (2002) *Mutations of the BRAF gene in human cancer*. Nature. **417**(6892): p. 949-54.
27. Fésüs, L., *A sejtproliferáció és a természetes sejthalál biokémiája*. In: Ádám V., Dux L., Faragó A., Fésüs L., Machovich R., Mandl J., Sümegi B. (szerk.), *Orvosi Biokémia Medicina Könyvkiadó Zrt., Budapest, 2004: 505-519.*

28. Sithanandam, G., T. Druck, L.A. Cannizzaro, G. Leuzzi, K. Huebner, and U.R. Rapp (1992) *B-raf and a B-raf pseudogene are located on 7q in man*. *Oncogene*. **7**(4): p. 795-9.
29. Oakley, G.M., K. Curtin, L. Layfield, E. Jarboe, L.O. Buchmann, and J.P. Hunt (2014) *Increased melanoma risk in individuals with papillary thyroid carcinoma*. *JAMA Otolaryngol Head Neck Surg*. **140**(5): p. 423-7.
30. Nucera, C., J. Lawler, and S. Parangi (2011) *BRAF(V600E) and microenvironment in thyroid cancer: a functional link to drive cancer progression*. *Cancer Res*. **71**(7): p. 2417-22.
31. Xing, M. (2007) *BRAF mutation in papillary thyroid cancer: pathogenic role, molecular bases, and clinical implications*. *Endocr Rev*. **28**(7): p. 742-62.
32. Pennelli, G., F. Vianello, S. Barollo, R. Pezzani, I. Merante Boschin, M.R. Pelizzo, F. Mantero, M. Rugge, and C. Mian (2011) *BRAF(K601E) mutation in a patient with a follicular thyroid carcinoma*. *Thyroid*. **21**(12): p. 1393-6.
33. Nikiforov, Y.E.M.N. Nikiforova (2011) *Molecular genetics and diagnosis of thyroid cancer*. *Nat Rev Endocrinol*. **7**(10): p. 569-80.
34. Bernstein, J., R.K. Virk, P. Hui, A. Prasad, W.H. Westra, G. Tallini, A.J. Adeniran, R. Udelsman, C.T. Sasaki, S.A. Roman, J.A. Sosa, and M.L. Prasad (2013) *Tall cell variant of papillary thyroid microcarcinoma: clinicopathologic features with BRAF(V600E) mutational analysis*. *Thyroid*. **23**(12): p. 1525-31.
35. Walts, A.E., A. Pao, W. Sacks, and S. Bose (2014) *BRAF genetic heterogeneity in papillary thyroid carcinoma and its metastasis*. *Hum Pathol*. **45**(5): p. 935-41.
36. Zheng, X., S. Wei, Y. Han, Y. Li, Y. Yu, X. Yun, X. Ren, and M. Gao (2013) *Papillary microcarcinoma of the thyroid: clinical characteristics and BRAF(V600E) mutational status of 977 cases*. *Ann Surg Oncol*. **20**(7): p. 2266-73.
37. Nikiforova, M.N.Y.E. Nikiforov (2008) *Molecular genetics of thyroid cancer: implications for diagnosis, treatment and prognosis*. *Expert Rev Mol Diagn*. **8**(1): p. 83-95.
38. Nikiforova, M.N., E.T. Kimura, M. Gandhi, P.W. Biddinger, J.A. Knauf, F. Basolo, Z. Zhu, R. Giannini, G. Salvatore, A. Fusco, M. Santoro, J.A. Fagin, and Y.E. Nikiforov (2003) *BRAF mutations in thyroid tumors are restricted to papillary carcinomas and anaplastic or poorly differentiated carcinomas arising from papillary carcinomas*. *J Clin Endocrinol Metab*. **88**(11): p. 5399-404.
39. Gandolfi, G., V. Sancisi, F. Torricelli, M. Ragazzi, A. Frasoldati, S. Piana, and A. Ciarrocchi (2013) *Allele percentage of the BRAF V600E mutation in papillary thyroid carcinomas and corresponding lymph node metastases: no evidence for a role in tumor progression*. *J Clin Endocrinol Metab*. **98**(5): p. E934-42.
40. Xing, M., B.R. Haugen, and M. Schlumberger (2013) *Progress in molecular-based management of differentiated thyroid cancer*. *Lancet*. **381**(9871): p. 1058-69.
41. Guerra, A., L. Fugazzola, V. Marotta, M. Cirillo, S. Rossi, V. Cirello, I. Forno, T. Moccia, A. Budillon, and M. Vitale (2012) *A high percentage of BRAFV600E alleles in papillary thyroid carcinoma predicts a poorer outcome*. *J Clin Endocrinol Metab*. **97**(7): p. 2333-40.
42. Fugazzola, L., E. Puxeddu, N. Avenia, C. Romei, V. Cirello, A. Cavaliere, P. Faviana, D. Mannavola, S. Moretti, S. Rossi, M. Sculli, V. Bottici, P. Beck-

- Peccoz, F. Pacini, A. Pinchera, F. Santeusano, and R. Elisei (2006) *Correlation between B-RAF(V600E) mutation and clinico-pathologic parameters in papillary thyroid carcinoma: data from a multicentric Italian study and review of the literature*. *Endocr Relat Cancer*. **13**(2): p. 455-464.
43. Xing, M., D. Clark, H. Guan, M. Ji, A. Dackiw, K.A. Carson, M. Kim, A. Tufaro, P. Ladenson, M. Zeiger, and R. Tufano (2009) *BRAF mutation testing of thyroid fine-needle aspiration biopsy specimens for preoperative risk stratification in papillary thyroid cancer*. *J Clin Oncol*. **27**(18): p. 2977-82.
 44. Trovisco, V., P. Soares, A. Preto, I.V. de Castro, J. Lima, P. Castro, V. Maximo, T. Botelho, S. Moreira, A.M. Meireles, J. Magalhaes, A. Abrosimov, J. Cameselle-Teijeiro, and M. Sobrinho-Simoes (2005) *Type and prevalence of BRAF mutations are closely associated with papillary thyroid carcinoma histotype and patients' age but not with tumour aggressiveness*. *Virchows Arch*. **446**(6): p. 589-95.
 45. Fugazzola, L., E. Puxeddu, N. Avenia, C. Romei, V. Cirello, A. Cavaliere, P. Faviana, D. Mannavola, S. Moretti, S. Rossi, M. Sculli, V. Bottici, P. Beck-Peccoz, F. Pacini, A. Pinchera, F. Santeusano, and R. Elisei (2006) *Correlation between B-RAFV600E mutation and clinico-pathologic parameters in papillary thyroid carcinoma: data from a multicentric Italian study and review of the literature*. *Endocr Relat Cancer*. **13**(2): p. 455-64.
 46. Eszlinger, M., M. Niedziela, E. Typlt, H. Jaeschke, S. Huth, J. Schaarschmidt, T. Aigner, E. Trejster, K. Krohn, E. Bosenberg, and R. Paschke (2014) *Somatic mutations in 33 benign and malignant hot thyroid nodules in children and adolescents*. *Mol Cell Endocrinol*. **393**(1-2): p. 39-45.
 47. Stanojevic, B., R. Dzodic, V. Saenko, Z. Milovanovic, G. Pupic, O. Zivkovic, I. Markovic, I. Djuricic, M. Buta, B. Dimitrijevic, T. Rogounovitch, N. Mitsutake, M. Mine, Y. Shibata, M. Nakashima, and S. Yamashita (2011) *Mutational and clinico-pathological analysis of papillary thyroid carcinoma in Serbia*. *Endocr J*. **58**(5): p. 381-93.
 48. Czarniecka, A., D. Rusinek, E. Stobiecka, J. Krajewska, M. Kowal, A. Kropinska, J. Zebracka, M. Kowalska, J. Wloch, A. Maciejewski, and D. Handkiewicz-Junak (2010) *Occurrence of BRAF mutations in a Polish cohort of PTC patients - preliminary results*. *Endokrynol Pol*. **61**(5): p. 462-6.
 49. Goutas, N., D. Vlachodimitropoulos, M. Bouka, A.C. Lazaris, G. Nasioulas, and M. Gazouli (2008) *BRAF and K-RAS mutation in a Greek papillary and medullary thyroid carcinoma cohort*. *Anticancer Res*. **28**(1A): p. 305-8.
 50. Givens, D.J., L.O. Buchmann, A.M. Agarwal, J.F. Grimmer, and J.P. Hunt (2014) *BRAF V600E does not predict aggressive features of pediatric papillary thyroid carcinoma*. *Laryngoscope*. **124**(9): p. E389-93.
 51. Prior, I.A., P.D. Lewis, and C. Mattos (2012) *A comprehensive survey of Ras mutations in cancer*. *Cancer Res*. **72**(10): p. 2457-67.
 52. Califano, R., L. Landi, and F. Cappuzzo (2012) *Prognostic and predictive value of K-RAS mutations in non-small cell lung cancer*. *Drugs*. **72 Suppl 1**: p. 28-36.
 53. Guldenhaupt, J., T. Rudack, P. Bachler, D. Mann, G. Triola, H. Waldmann, C. Kotting, and K. Gerwert (2012) *N-Ras forms dimers at POPC membranes*. *Biophys J*. **103**(7): p. 1585-93.

54. Helbig, G.J. Holowiecki (2004) *[Ras signaling pathway as a target for farnesyltransferase inhibitors--a new, promising prospects in the treatment for malignant disorders]*. Wiad Lek. **57**(9-10): p. 462-7.
55. Mishra, A., V. Agrawal, N. Krishnani, and S.K. Mishra (2009) *Prevalence of RET/PTC expression in papillary thyroid carcinoma and its correlation with prognostic factors in a north Indian population*. J Postgrad Med. **55**(3): p. 171-5.
56. Sugg, S.L., S. Ezzat, I.B. Rosen, J.L. Freeman, and S.L. Asa (1998) *Distinct multiple RET/PTC gene rearrangements in multifocal papillary thyroid neoplasia*. J Clin Endocrinol Metab. **83**(11): p. 4116-22.
57. Raman, P.R.J. Koenig (2014) *Pax-8-PPAR-gamma fusion protein in thyroid carcinoma*. Nat Rev Endocrinol. **10**(10): p. 616-623.
58. Prasad, N.B., J. Kowalski, H.L. Tsai, K. Talbot, H. Somervell, G. Kouniavsky, Y. Wang, A.P. Dackiw, W.H. Westra, D.P. Clark, S.K. Libutti, C.B. Umbricht, and M.A. Zeiger (2012) *Three-gene molecular diagnostic model for thyroid cancer*. Thyroid. **22**(3): p. 275-84.
59. Boudreau, A., K. Tanner, D. Wang, F.C. Geyer, J.S. Reis-Filho, and M.J. Bissell (2013) *14-3-3sigma stabilizes a complex of soluble actin and intermediate filament to enable breast tumor invasion*. Proc Natl Acad Sci U S A. **110**(41): p. E3937-44.
60. Aitken, A. (2006) *14-3-3 proteins: a historic overview*. Semin Cancer Biol. **16**(3): p. 162-72.
61. Wang, Z., C.G. Trope, Z. Suo, G. Troen, G. Yang, J.M. Nesland, and R. Holm (2008) *The clinicopathological and prognostic impact of 14-3-3 sigma expression on vulvar squamous cell carcinomas*. BMC Cancer. **8**: p. 308.
62. Kogianni, G., M.M. Walker, J. Waxman, and J. Sturge (2009) *Endo180 expression with cofunctional partners MT1-MMP and uPAR-uPA is correlated with prostate cancer progression*. Eur J Cancer. **45**(4): p. 685-93.
63. Gai, X., K. Tu, Z. Lu, and X. Zheng (2014) *MRC2 Expression Correlates with TGFbeta1 and Survival in Hepatocellular Carcinoma*. Int J Mol Sci. **15**(9): p. 15011-25.
64. Hristov, A.C., L. Cope, M.D. Reyes, M. Singh, C. Iacobuzio-Donahue, A. Maitra, and L.M. Resar (2009) *HMGA2 protein expression correlates with lymph node metastasis and increased tumor grade in pancreatic ductal adenocarcinoma*. Mod Pathol. **22**(1): p. 43-9.
65. Sarhadi, V.K., H. Wikman, K. Salmenkivi, E. Kuosma, T. Sioris, J. Salo, A. Karjalainen, S. Knuutila, and S. Anttila (2006) *Increased expression of high mobility group A proteins in lung cancer*. J Pathol. **209**(2): p. 206-12.
66. Rogalla, P., K. Drechsler, B. Kazmierczak, V. Rippe, U. Bonk, and J. Bullerdiek (1997) *Expression of HMGI-C, a member of the high mobility group protein family, in a subset of breast cancers: relationship to histologic grade*. Mol Carcinog. **19**(3): p. 153-6.
67. Chung, M., E.M. Balk, M. Brendel, S. Ip, J. Lau, J. Lee, A. Lichtenstein, K. Patel, G. Raman, A. Tatsioni, T. Terasawa, and T.A. Trikalinos (2009) *Vitamin D and calcium: a systematic review of health outcomes*. Evid Rep Technol Assess (Full Rep),(183): p. 1-420.

68. Krishnan, A.V., D.L. Trump, C.S. Johnson, and D. Feldman (2010) *The role of vitamin D in cancer prevention and treatment*. Endocrinol Metab Clin North Am. **39**(2): p. 401-18, table of contents.
69. Kriebitzsch, C., L. Verlinden, G. Eelen, B.K. Tan, M. Van Camp, R. Bouillon, and A. Verstuyf (2009) *The impact of 1,25(OH)₂D₃ and its structural analogs on gene expression in cancer cells--a microarray approach*. Anticancer Res. **29**(9): p. 3471-83.
70. Horvath, H.C., P. Lakatos, J.P. Kosa, K. Bacsi, K. Borka, G. Bises, T. Nittke, P.A. Hershberger, G. Speer, and E. Kallay (2010) *The candidate oncogene CYP24A1: A potential biomarker for colorectal tumorigenesis*. J Histochem Cytochem. **58**(3): p. 277-85.
71. Khadz Kou, K., P. Buchwald, G. Westin, H. Dralle, G. Akerstrom, and P. Hellman (2006) *25-hydroxyvitamin D₃ 1 α -hydroxylase and vitamin D receptor expression in papillary thyroid carcinoma*. J Histochem Cytochem. **54**(3): p. 355-61.
72. Nikiforov, Y.E., D.L. Steward, T.M. Robinson-Smith, B.R. Haugen, J.P. Klover, Z. Zhu, J.A. Fagin, M. Falciglia, K. Weber, and M.N. Nikiforova (2009) *Molecular testing for mutations in improving the fine-needle aspiration diagnosis of thyroid nodules*. J Clin Endocrinol Metab. **94**(6): p. 2092-8.
73. McLeod, D.S., A.M. Sawka, and D.S. Cooper (2013) *Controversies in primary treatment of low-risk papillary thyroid cancer*. Lancet. **381**(9871): p. 1046-57.
74. Eszlinger, M., A. Krogdahl, S. Munz, C. Rehfeld, E.M. Precht Jensen, C. Ferraz, E. Bosenberg, N. Drieschner, M. Scholz, L. Hegedus, and R. Paschke (2014) *Impact of molecular screening for point mutations and rearrangements in routine air-dried fine-needle aspiration samples of thyroid nodules*. Thyroid. **24**(2): p. 305-13.
75. Guerra, A., P. Zeppa, M. Bifulco, and M. Vitale (2014) *Concomitant BRAF(V600E) mutation and RET/PTC rearrangement is a frequent occurrence in papillary thyroid carcinoma*. Thyroid. **24**(2): p. 254-9.
76. Elisei, R. (2014) *Molecular profiles of papillary thyroid tumors have been changing in the last decades: how could we explain it?* J Clin Endocrinol Metab. **99**(2): p. 412-4.
77. Rossi, E.D., M. Martini, S. Capodimonti, C.P. Lombardi, A. Pontecorvi, V.G. Vellone, G.F. Zannoni, L.M. Larocca, and G. Fadda (2013) *BRAF (V600E) mutation analysis on liquid-based cytology-processed aspiration biopsies predicts bilaterality and lymph node involvement in papillary thyroid microcarcinoma*. Cancer Cytopathol. **121**(6): p. 291-7.
78. Bellevicine, C., I. Cozzolino, U. Malapelle, P. Zeppa, and G. Troncone (2012) *Cytological and molecular features of papillary thyroid carcinoma with prominent hobnail features: a case report*. Acta Cytol. **56**(5): p. 560-4.
79. Guan, H., M. Ji, R. Bao, H. Yu, Y. Wang, P. Hou, Y. Zhang, Z. Shan, W. Teng, and M. Xing (2009) *Association of high iodine intake with the T1799A BRAF mutation in papillary thyroid cancer*. J Clin Endocrinol Metab. **94**(5): p. 1612-7.
80. Gandhi, M., V. Evdokimova, and Y.E. Nikiforov (2010) *Mechanisms of chromosomal rearrangements in solid tumors: the model of papillary thyroid carcinoma*. Mol Cell Endocrinol. **321**(1): p. 36-43.
81. Zou, M., E.Y. Baitei, A.S. Alzahrani, F.S. BinHumaid, D. Alkhafaji, R.A. Al-Rijjal, B.F. Meyer, and Y. Shi (2014) *Concomitant RAS, RET/PTC, or BRAF*

- Mutations in Advanced Stage of Papillary Thyroid Carcinoma*. *Thyroid*. **24**(8): p. 1256-66.
82. Di Cristofaro, J., M. Marcy, V. Vasko, F. Sebag, N. Fakhry, D. Wynford-Thomas, and C. De Micco (2006) *Molecular genetic study comparing follicular variant versus classic papillary thyroid carcinomas: association of N-ras mutation in codon 61 with follicular variant*. *Hum Pathol*. **37**(7): p. 824-30.
 83. Nikiforov, Y.E. (2002) *RET/PTC rearrangement in thyroid tumors*. *Endocr Pathol*. **13**(1): p. 3-16.
 84. Leeman-Neill, R.J., A.V. Brenner, M.P. Little, T.I. Bogdanova, M. Hatch, L.Y. Zurnadzy, K. Mabuchi, M.D. Tronko, and Y.E. Nikiforov (2013) *RET/PTC and PAX8/PPARgamma chromosomal rearrangements in post-Chernobyl thyroid cancer and their association with iodine-131 radiation dose and other characteristics*. *Cancer*. **119**(10): p. 1792-9.
 85. Koenig, R.J. (2010) *Detection of the PAX8-PPARgamma fusion protein in thyroid tumors*. *Clin Chem*. **56**(3): p. 331-3.
 86. Armstrong, M.J., H. Yang, L. Yip, N.P. Otori, K.L. McCoy, M.T. Stang, S.P. Hodak, M.N. Nikiforova, S.E. Carty, and Y.E. Nikiforov (2014) *PAX8/PPARgamma Rearrangement in Thyroid Nodules Predicts Follicular-Pattern Carcinomas, in Particular the Encapsulated Follicular Variant of Papillary Carcinoma*. *Thyroid*.
 87. Castro, P., A.P. Rebocho, R.J. Soares, J. Magalhaes, L. Roque, V. Trovisco, I. Vieira de Castro, M. Cardoso-de-Oliveira, E. Fonseca, P. Soares, and M. Sobrinho-Simoes (2006) *PAX8-PPARgamma rearrangement is frequently detected in the follicular variant of papillary thyroid carcinoma*. *J Clin Endocrinol Metab*. **91**(1): p. 213-20.
 88. Klemke, M., N. Drieschner, G. Belge, K. Burchardt, K. Junker, and J. Bullerdiek (2012) *Detection of PAX8-PPARG fusion transcripts in archival thyroid carcinoma samples by conventional RT-PCR*. *Genes Chromosomes Cancer*. **51**(4): p. 402-8.
 89. Balla, B., J.P. Kosa, B. Tobias, C. Halaszlaki, I. Takacs, H. Horvath, G. Speer, Z. Nagy, J. Horanyi, B. Jaray, E. Szekely, and P. Lakatos (2011) *Marked increase in CYP24A1 gene expression in human papillary thyroid cancer*. *Thyroid*. **21**(4): p. 459-60.
 90. Balla, B., B. Tobias, J.P. Kosa, J. Podani, P. Horvath, Z. Nagy, J. Horanyi, B. Jaray, E. Szekely, L. Krenacs, K. Arvai, M. Dank, Z. Putz, B. Szabo, B. Szili, Z. Valkusz, B. Vasas, G. Gyori, P. Lakatos, and I. Takacs (2014) *Vitamin D-neutralizing CYP24A1 expression, oncogenic mutation states and histological findings of human papillary thyroid cancer*. *J Endocrinol Invest*.
 91. Sharma, V., D. Fretwell, Z. Crees, A. Kerege, and J.P. Klover (2010) *Thyroid cancer resistance to vitamin D receptor activation is associated with 24-hydroxylase levels but not the ff FokI polymorphism*. *Thyroid*. **20**(10): p. 1103-11.
 92. Clinckspoor, I., L. Verlinden, C. Mathieu, R. Bouillon, A. Verstuyf, and B. Decallonne (2013) *Vitamin D in thyroid tumorigenesis and development*. *Prog Histochem Cytochem*. **48**(2): p. 65-98.
 93. Clinckspoor, I., E. Hauben, L. Verlinden, A. Van den Bruel, L. Vanwallegheem, V. Vander Poorten, P. Delaere, C. Mathieu, A. Verstuyf, and B. Decallonne (2012) *Altered expression of key players in vitamin D metabolism and signaling*

- in malignant and benign thyroid tumors*. J Histochem Cytochem. **60**(7): p. 502-11.
94. Carpi, A., J.I. Mechanick, S. Saussez, and A. Nicolini (2010) *Thyroid tumor marker genomics and proteomics: diagnostic and clinical implications*. J Cell Physiol. **224**(3): p. 612-9.
 95. Boric, M., J. Stanicic, N. Dabelic, T. Jukic, and Z. Kusic (2009) *Iodine supplementation in pregnancy*. Acta Clin Croat. **48**(4): p. 469-73.
 96. Goretzki, P.E., J. Witte, C. Dotzenrath, K.M. Schulte, D. Simon, and H.D. Roher (1998) *[Geographical differences of thyroid carcinoma and basic molecular principles]*. Langenbecks Arch Chir Suppl Kongressbd. **115**: p. 200-2.
 97. Fleury, Y., G. van Melle, V. Woringen, E. Temler, R.C. Gaillard, and L. Portmann (1999) *[Iodine nutrition and prevalence of goiter in adolescents in the Canton of Vaud]*. Schweiz Med Wochenschr. **129**(47): p. 1831-8.
 98. Shi, Y.F., M.J. Zou, H. Schmidt, F. Juhasz, V. Stensky, D. Robb, and N.R. Farid (1991) *High rates of ras codon 61 mutation in thyroid tumors in an iodide-deficient area*. Cancer Res. **51**(10): p. 2690-3.
 99. Vanderpump, M.P., J.H. Lazarus, P.P. Smyth, P. Laurberg, R.L. Holder, K. Boelaert, J.A. Franklyn, and U.K.I.S.G. British Thyroid Association (2011) *Iodine status of UK schoolgirls: a cross-sectional survey*. Lancet. **377**(9782): p. 2007-12.
 100. Szybinski, Z. (2009) *[Iodine prophylaxis in Poland in light of the WHO recommendation on reduction of the daily salt intake]*. Pediatr Endocrinol Diabetes Metab. **15**(2): p. 103-7.
 101. Moreno-Reyes, R., H. Van Oyen, and S. Vandevijvere (2011) *Optimization of iodine intake in Belgium*. Ann Endocrinol (Paris). **72**(2): p. 158-61.
 102. Lind, P., G. Kumnig, M. Heinisch, I. Igerc, P. Mikosch, H.J. Gallowitsch, E. Kresnik, I. Gomez, O. Unterweger, and H. Aigner (2002) *Iodine supplementation in Austria: methods and results*. Thyroid. **12**(10): p. 903-7.
 103. Guo, H.Q., H. Zhao, Z.H. Zhang, Y.L. Zhu, T. Xiao, and Q.J. Pan (2014) *Impact of molecular testing in the diagnosis of thyroid fine needle aspiration cytology: data from mainland China*. Dis Markers. **2014**: p. 912182.

9. SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE

A disszertációhoz kapcsolódó publikációk:

Balla, B., J.P. Kosa, **B. Tobias**, C. Halaszlaki, I. Takacs, H. Horvath, G. Speer, Z. Nagy, J. Horanyi, B. Jaray, E. Szekely, and P. Lakatos (2011) *Marked increase in CYP24A1 gene expression in human papillary thyroid cancer*. **Thyroid**. **21**(4): p. 459-60.

Tobias, B., B. Balla, P.J. Kosa, J. Horanyi, I. Takacs, E. Bolony, C. Halaszlaki, Z. Nagy, G. Speer, B. Jaray, E. Szekely, R. Istok, and P. Lakatos (2011) *[Comparative study of somatic oncogene mutations in normal thyroid tissues and thyroid neoplasms]*. **Orv Hetil**. **152**(17): p. 672-7.

Balla B*; **Tobias B***; Kosa JP; Podani J; Horvath P; Nagy Z; Horanyi J; Jaray B; Szekely E; Krenacs L; Arvai K; Dank M; Putz Z; Szabo B; Szili B; Valkusz Z; Vasas B; Gyori G; Lakatos P; Takacs I (2014) *Vitamin D-neutralizing CYP24A1 expression, oncogenic mutation states and histological findings of human papillary thyroid cancer*. **JOURNAL OF ENDOCRINOLOGICAL INVESTIGATION** (epub)

(* = a szerzők azonos mértékben vettek részt a cikk megszületésében)

A disszertációtól független publikációk:

Lazary A, Kosa JP, **Tobias B**, Lazary J, Balla B, Bacsı K, Takacs I, Nagy Z, Mezo T, Speer G, Lakatos P (2008) Single nucleotide polymorphisms in new candidate genes are associated with bone mineral density and fracture risk. **EUROPEAN JOURNAL OF ENDOCRINOLOGY** 159:(2) p. 187-196.

Bakos B, Takács I, Ternai Z, Nagy Zs, Kósa PJ, Balla B, **Tóbiás B**, Halászlaki Cs, Szili B, Lakatos P (2011) *A hyperthyreosisok radiojódkezelésének hosszú távú hatékonysága* **MAGYAR BELORVOSI ARCHIVUM** 64:(5) pp. 289-293.

Balla B, Vaszilko M, Kosa J, Podani J, Takacs I, **Tobias B**, Nagy Z, Lazary A, Lakatos P (2012) *New approach to analyze genetic and clinical data in bisphosphonate-induced osteonecrosis of the jaw*. **ORAL DISEASES** 18:(6) pp. 580-585.

Horvath Evelin, Lakatos Peter, Balla Bernadett, Kosa Janos Pal, **Tobias Balint**, Jozilan Hasan, Borka Katalin, Horvath Henrik Csaba, Kovalszky Ilona, Szalay Ferenc (2012) *Marked Increase of CYP24A1 mRNA Level in Hepatocellular Carcinoma Cell Lines Following Vitamin D Administration* **ANTICANCER RESEARCH** 32:(11) pp. 4791-4796.

Árvai K, Kósa J, Horváth P, Balla B, **Tóbiás B**, Takács I, Nagy Zs, Lakatos P (2013) *Osteogenesis imperfecta rutin genetikai diagnosztikája új generációs szekvenálási (NGS) technológiával* **MAGYAR BELORVOSI ARCHIVUM** 66:(5) pp. 280-284.

Bakos B, Takacs I, Nagy Z, Kosa JP, Balla B, **Tobias B**, Halaszlaki C, Szili B, Lakatos P (2013) *Long term efficacy of radioiodine treatment in hyperthyroidism. EXPERIMENTAL AND CLINICAL ENDOCRINOLOGY & DIABETES* 121:(8) pp. 494-497.

Arvai K, Horvath P, Balla B, Tokes AM, **Tobias B**, Takacs I, Nagy Z, Lakatos P, Kosa JP (2014) *Rapid and cost effective screening of breast and ovarian cancer genes using novel sequence capture method in clinical samples.***FAMILIAL CANCER** epub: p. §.

Balla B, Arvai K, Horvath P, **Tobias B**, Takacs I, Nagy Z, Dank M, Fekete G, Kosa JP, Lakatos P (2014) *Fast and Robust Next-Generation Sequencing Technique Using Ion Torrent Personal Genome Machine for the Screening of Neurofibromatosis Type 1 (NF1) Gene.* **JOURNAL OF MOLECULAR NEUROSCIENCE** 53:(2) pp. 204-210.

10. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Több szempontból is hálás köszönettel tartozom *Lakatos Péter* professzor úrnak, aki lehetővé tette érdeklődő középiskolásoknak – köztük jómagamnak -, hogy közelebbről megismerkedhessünk a genetika rejtelseivel. Abból az egy hétből 10 év és sok közös munka lett, majd témavezetőként atyai gondoskodásával támogatott, segített belépni a tudomány világába.

Hálámat és külön baráti köszönetemet fejezem ki *Dr. Kósa János*nak, hogy ezalatt a hosszú idő alatt folyamatosan tanulhattam tőle, támogatott munkám során.

Különös hálával és baráti köszönettel tartozom *Dr. Balla Bernadett*nek az együtt végzett munkákért, a szakmai segítségért és iránymutatásért.

Köszönetemet fejezem ki a kutatócsoport és laboratórium többi munkatársának, *Árvai Kristófnak, Máté Editnek, Keresztényi Györgyinek, Szabóné Sinkovits Tündének, Horváth Beatrixnak, Nagyné Török Anikónak, Kövesdi Andreának, Árendás Mónikának, dr. Horváth Péternek, dr. Takács Istvánnak, dr. Nagy Zsolnak, dr. Tóth Tamásnak*, hogy türelmesek voltak velem, segítettek, támogattak és sok hasznos tanáccsal láttak el az elmúlt évek alatt.

Szeretnék köszönetet mondani az I. sz. Sebészeti Klinikáról *dr. Horányi János*nak, a Radológiai és Onkoterápiás Klinikáról *dr. Győri Gabriellának*, hogy részt vállaltak a kutatómunkámban.

Köszönetet szeretnék mondani az Egyetem II. sz. Patológiai Intézet munkatársainak, legfőbbképp *dr. Járay Baláznak, dr. Székely Eszternek, dr. Istók Rolandnak, dr. Székely Tamásnak és Kalocsáné Pjurkó Violettnak*, akik segítsége és szakmai tudása nélkül nem jöhetett volna létre ez a munka.

Hálás vagyok a Szegedi Tudományegyetem Általános Orvostudományi Kar dolgozóinak, név szerint *dr. Valkusz Zsuzsannának, Dr. Iványi Béla* professzor úrnak, *dr. Vasas Bélának*, akik segítették kutatásunkat.

Végül, de nem utolsó sorban hálás köszönettel tartozom szüleimnek és testvéremnek, akik mellettem álltak az olykor rögsnek látszó úton és lehetőségeikhez mértén támogatták e munka megszületését.

**Ezt a munkát a családomnak
és a barátaimnak ajánlom.**

Köszönöm!

**This work is dedicated to
my family and friends.**

Thank you!

11. MELLÉKLETEK

1. melléklet: Etikai engedély

Egészségügyi Tudományos Tanács
Tudományos és Kutatásetikai Bizottság (ETT TUKEB)
Egészségügyi Tudományos Tanács Titkárság
Budapest 1051 Arany János u. 6-8.

Ügyiratszám: 1160-0/2010-1018EKU (57/PI/10.)
Ügyintéző neve: Dr. Temesi Alfréda igazgató
ETT Titkárság
Elérhetősége: (06-1)-795-1197
Mobil készülékről: 06-30-795-1197
Melléklet: 1 db

Tárgy: Dr. Takács István
(Semmelweis Egyetem Általános
Orvostudományi Kar I. Számú
Belgyógyászati Klinika (Budapest
1085 Üllői út 25.) kérelme,
szakhatósági állásfoglalás tárgyában

SZAKHATÓSÁGI ÁLLÁSFOGLALÁS

Dr. Takács István részére „Genetikai tényezők vizsgálata a pajzsmirigy-rák kialakulásában” című kutatás engedélyezése tárgyában benyújtott kérelmét, mint szakhatóság (2010. február 16-i ülésen) az alábbiak szerint bíráltam el.

A benyújtott kutatási engedély tárgyában a kutatási tervhez küldött kiegészítések áttanulmányozása alapján

a szakmai-etikai engedélyt megadom.

A vizsgálat feltételei teljesültek.

Hatóságom hatáskörét és illetékességét az Állami Népegészségügyi és Tisztiorvosi Szolgálatról és a gyógyszerészeti államigazgatási szerv kijelöléséről szóló 362/2006. (XII. 28.) Korm. rendelet 18/A. § (8) bekezdésének b) pontja állapítja meg.

Jelen szakhatósági állásfoglalás ellen a közigazgatási hatósági eljárás és szolgáltatás általános szabályairól szóló 2004. évi CXL. törvény 44. §-ának (9) bekezdése alapján külön fellebbezésnek helye nincs, az ügyfél az ügy érdemében hozott határozat ellen irányuló fellebbezésében gyakorolhatja az ezzel kapcsolatos jogorvoslati jogát.

Dr. Papp Zoltán
egyetemi tanár

Altaglak:
Dr. Vécsei László
egyetemi tanár

Titkár:
Dr. Székely László
egyetemi docens

Titkárhelyettes:
Dr. Rigo János
egyetemi tanár

Tanács:
Dr. Becsényi István
egyetemi tanár

Dr. Bodó György
egyetemi magántanár

Dr. Demeter Judit
egyetemi tanár

Dr. Dobos Attila
egyetemi tanár

Dr. Falus András
egyetemi tanár

Dr. Fazakas Sándor
református lelkész

Dr. Fenyvesi Tamás
egyetemi tanár

Dr. János János
egyetemi tanár

Dr. Kádár György
egyetemi tanár

Dr. Kiss János
egyetemi tanár

Dr. Kovács József
egyetemi docens

Levegő Anna
igazgató

Dr. Matkó Ida
egyetemi docens

Dr. Mayer Árpád
egyetemi magántanár

Dr. Mericsy Béla
egyetemi tanár

Dr. Molnár Dénes
egyetemi tanár

Dr. Nussbék Katalin
alapítványi igazgató

Dr. Nagy Zoltán
egyetemi tanár

Dr. Oberfrank Ferenc
címzetes egyetemi docens

Dr. Oláh Edit
egyetemi tanár

Dr. Rajkovich Bernadette
főorvos

Dr. Sándor Judit
egyetemi tanár

Dr. Sreter László
egyetemi tanár

Székely Miklós
német, franciáadó

Dr. Szeveg István
egyetemi tanár

Dr. Székely Ince
háziállat orvos

Dr. Tóth Klára
egyetemi docens

Dr. Ungváry György
egyetemi tanár

Dr. Varró András
egyetemi tanár

Várnai József
ápolási igazgató

Vető Tamás
rábi

MELLÉKLET A(Z)
57/PI/10., 1160-0/2010-1018E KU
SZÁMÚ
SZAKHATÓSÁGI ÁLLÁSFOGLALÁSHOZ

SZAKMAI – ETIKAI VÉLEMÉNY

„Genetikai tényezők vizsgálata a pajzsmirigy rák kialakulásában” című kutatáshoz

A Bizottság szakmai-etikai szempontból – a kutatási tervhez küldött kiegészítések áttanulmányozása alapján - hozzájárul a kutatás elvégzéséhez.

Budapest, 2010. április 28.



[Handwritten signature]
Dr. Papp Zoltán
egyetemi tanár,
az ETT TUKEB elnöke

2. melléklet: Beleegyező nyilatkozat


SEMMEIWEIS EGYETEM
Általános Orvostudományi Kar

I. sz. Belgyógyászati Klinika
 Igazgató: Prof. Dr. Szathmári Miklós
 1083. Budapest, Korányi Sándor u. 2/a.
 Tel.: 459-1500 Fax: 313-0250


Genetikai tényezők vizsgálata a pajzsmirigyrák kialakulásában
TÁJÉKOZTATÓ A VIZSGÁLATBAN RÉSZTVEVŐK RÉSZÉRE

Tisztelt Résztvevő,

1. A vizsgálat célja

A pajzsmirigy göbös megbetegedéseinek csupán töredéke rosszindulatú tumor. Ezen tumorok nagyobbik része jól kezelhető, azonban a kezelés sikerességét alapvetően befolyásolja a diagnózis időpontja. Jelenleg finomtü biopsziával (FNAB) diagnosztizáljuk a tumor fajtáját, de ez a módszer sem képes 100 %-ban pontos diagnózist adni. Vizsgálatunk célja genetikai vizsgálattal növelni a diagnosztikus pontosságot.

2. A vizsgálat vezetője

A vizsgálat vezetői Dr. Takács István és Prof. Dr. Lakatos Péter a Semmelweis Egyetem I. sz. Belgyógyászati Klinikájának tanárai. A genetikai vizsgálatok és a genetikai minták tárolása az I. sz. Belgyógyászati Klinika Klinikai Kutató és Izotópdiaosztikai Laboratóriumában történnek.

3. A vizsgálat leírása és az alkalmazott módszerek ismertetése

Az Ön részvétele esetén egy kérdőív kitöltésére kérjük meg, majd a vizsgálatához egyébként is szükséges mintavétellel nyert anyagmintából egy igen kis részt genetikai vizsgálatra különítünk el.

Ez a mintavétel lehet

1. Az Önnél végzett pajzsmirigy műtét során eltávolított daganat szövetből
2. Vagy nyaki göböl való vékonytü-mintavétel során a vett minta maradék anyagából.

A vizsgálat miatt sem több szúrás, sem nagyobb anyagkivétel nem történhet. A vizsgálatban való részvétel nem jár többlet beavatkozással illetve idővel, vagy bármilyen kellemetlenséggel. Nem okozhat egészségkárosodást Önnek.

Önt, féléves gyakorisággal, 3 évig követjük. Félévente áttekintjük orvosi papírjaikat. Elégtelen információ vagy tumor gyanú esetén felvesszük a kapcsolatot az Ön gondozó orvosával.

A levett mintákat és/vagy a mintákból kivont genetikai hordozó anyagot az I.sz. Belgyógyászati Klinika Kutató Laboratóriumában tároljuk a vizsgálat befejezéséig. A minták csak a fent említett molekuláris biológiai vizsgálatokra használhatók, és személyes adatok nélkül, titkos számkóddal

jelöljük. A titkos számkód csak arra használható, hogy a vizsgálathoz szükséges egyéb adatok a vizsgálat eredményével összevethetőek legyenek, és sosem használható arra, hogy a molekuláris analízist végző személy felvegye Önnel a kapcsolatot. A titkos számkódot Dr. Takács István jelöli ki, és a kódszám azonosításának módját csak Ő és egy általa kijelölt helyettesítő személy ismeri. Amennyiben szükségessé válik, a kapcsolatot ők tudják felvenni Önnel.

Az Ön vizsgálati mintáin és a kitöltött kérdőíven is csak a számkód tüntethető fel. A minták azonosítása nem nevek alapján történik, tehát a vizsgálati mintákból az Ön személyes adatai nem azonosíthatók. A genetikai vizsgálat eredményéből nem lehet következtetni az Ön személyére, és a személyazonosságot automatikusan a vizsgálat után sem fedik fel.

4. A vizsgálat során végzendő egyéb eljárások

A vizsgálat során csak a szokásos kivizsgálás során nyert adatokat használjuk fel, illetve a kezelés, kivizsgálás, műtéti beavatkozás során szokásosan nyert mintákból használunk fel egy kis mennyiséget genetikai meghatározásra. Ez a tudományos vizsgálat sem az Ön kivizsgálását, sem mintáinak értékelhetőségét nem befolyásolja.

5. A vizsgálatból származó előnyök – a vizsgálati eredmények megismerése

Az Ön számára a vizsgálat valószínűleg nem jár közvetlen előnyökkel. A vizsgált genetikai tényezők diagnosztikus szerepe jelenleg nem bizonyított, ezért azok most az Ön számára semmilyen biztos információt sem jelentenek.

Ön jogosult a vizsgált genetikai adatainak megismerésére. Ezt kérésére mintáinak visszakódolása után megtesszük. Amennyiben eredményeink, vagy a következő években megjelenő tudományos adatok alapján az általunk vizsgált genetikai variációk hatással lehetnek az Ön vagy vérszerinti rokonai egészségi állapotára. Azaz a vizsgált genetikai paraméterek diagnosztikus eszközzé válnak, akkor genetikai vizsgálati eredményéről személyesen tájékoztatjuk. Ekkor az Ön által megadott elérhetőségek valamelyikén személyes megbeszélésre hívjuk be. Amennyiben nem csak személyesen akar tudomást szerezni a genetikai eredményről, akkor teljes bizonyító erejű magánokiratban vagy írásképtelensége esetén két tanú együttes jelenlétében megtett szóbeli nyilatkozatával megnevezheti azt a személyt, aki jogosult genetikai adatait megismerni.

6. Kompenzáció

Anyagi ellenszolgáltatás a vizsgálatban való részvételért nem adható.

7. Terápiás beavatkozások a vizsgálat során

A vizsgálat nem foglal magába terápiás beavatkozást.

8. *A vizsgálat megszakítása*

Az Ön részvétele ebben a programban teljesen önkéntes, részvételi szándéka bármikor visszavonható. Amennyiben nem kíván részt venni a vizsgálatban, vagy részvételi szándékát a program során visszavonja, az semmilyen hátránnyal nem jár orvosi ellátásában. Részvétele az Ön beleegyezése nélkül abban az esetben vonható vissza, ha az orvosi vélemény szerint az indokolt.

Amennyiben úgy dönt, hogy részvételét a vizsgálatban megszakítja, kérjük szándékát jelezze szóban vagy írásban a 9. bekezdésben található elérhetőségek valamelyikén. Ekkor a bekódolt genetikai mintát a vizsgálatvezető visszakódolja (tehát az Ön mintáját kiemeljük a minták közül) és a mintát illetve a mintájával kapcsolatos eddigi eredményeket, csakúgy, mint a vizsgálatban rögzített klinikai adatait, ezek papír, elektronikus formáját megsemmisítjük az adatkezelési törvénynek és a biológiai hulladékkezelési szabályoknak megfelelően. A minta és az adatok megsemmisítése az Ön jelzését követő 8 napon belül megtörténik és erről Ön 15 munkanapon belül írásos értesítést kap, amennyiben erről az írásos értesítésről írásban nem mond le.

9. *Az adatok bizalmas kezelése*

Az Ön személyazonossága, személyes adatai és a vizsgálatok eredményei a nemzetközi jogi előírásokat tekintetbe véve és azoknak megfelelően szigorúan bizalmasan kezelendők. Az Ön adatai és a vizsgálatok során nyert eredmények szigorúan bizalmas kezelése szerint bizonyos adatok a vizsgálatot végzők, a szakmai etikai bizottság, illetve a hivatalos kormányzati felügyelők számára kiadható, amennyiben az nem jogellenes.

10. *Felmerülő kérdések*

Bármilyen, a vizsgálattal kapcsolatos egészségügyi probléma vagy megválaszolatlan kérdés esetén kérjük hívja munkaidőben Dr. Takács Istvánt a +36-1-459-1500 telefonszámon, vagy a nap 24 órájában Dr. Halászlaki Csabát a +36-20-2341-269 számon. Amennyiben Ön egy, a vizsgálattól független kutatóval kíván beszélni, kérjük hívja Dr. Nagy Zsoltot a +36-1-459-1500/1493 telefonszámon.

Mivel a vizsgálat érdekében semminemű orvosi beavatkozást sem végzünk, ezért Önt a vizsgálat során egészségkárosodás nem érheti. A beleegyező nyilatkozat aláírásával az Ön jogai nem sérülnek.

11. A vizsgálat, a betegtájékoztató anyag és a beteg beleegyező nyilatkozat mind formailag, mind tartalmilag megfelel a 2008. évi XXI. – a humángenetikai kutatásokról szóló – törvényben és a 235/2009. (X. 20.) Korm. rendeletben rögzítetteknek és a vizsgálatot az Egészségügyi Tudományos Tanács Tudományos és Kutatásetikai Bizottsága engedélyezte.

Köszönjük, hogy elolvasta tájékoztatónkat!



SEMMELWEIS EGYETEM
Általános Orvostudományi Kar

I. sz. Belgyógyászati Klinika
Igazgató: Dr. Szathmári Miklós
1083. Budapest, Korányi Sándor u. 2/a.
Tel.: 459-1500 Fax: 313-0250



GENETIKAI TÉNYEZŐK VIZSGÁLATA A PAJZSMIRIGYRÁK KIALAKULÁSÁBAN

a vizsgálat, a beteg tájékoztató anyag és a beteg beleegyező nyilatkozat mind formailag, mind tartalmilag megfelel a 2008. évi XXI. – a humángenetikai kutatásokról szóló – törvényben rögzítetteknek, illetve 235/2009. (X. 20.) Kormányrendeletnek és a 23/2002 EüM rendeletnek

BELEEGYEZŐ NYILATKOZAT

A vizsgálatról érthetően tájékoztattak és a vele kapcsolatos összes kérdésemre kielégítő választ kaptam. Tudomásul veszem, hogy a vizsgálat vezetői Dr. Takács István és Prof. Dr. Lakatos Péter, és a molekuláris biológiai vizsgálatot a Semmelweis Egyetem I. sz. Belgyógyászati Klinikán végzik, ahol 10 évig tárolják kódolt genetikai mintámat és kódolt klinikai adataimat és felhasználják a pajzsmirigy betegségekkel kapcsolatos kutatásokhoz. A beteg tájékoztatást a Semmelweis Egyetem I. sz. Sebészeti Klinikáján Dr. Horányi János, az Egyetem I. sz. Belgyógyászati Klinikáján Dr. Takács István és Dr. Halászlaki Csaba, az Országos Onkológiai Intézet Fej-Nyak Sebészeti Osztályán dr. Boér András végzi.

Alulírott,

NÉV: _____, szül idő/hely:

Anyja neve: _____, Lakcíme:

TAJ-szám: _____ - _____ - _____

- Önkéntesen és befolyástól mentesen hozzájárulok, hogy a pajzsmirigy betegségek genetikai hátterének felderítését célzó kutatáshoz tőlem genetikai mintát vegyenek és a kódolt genetikai mintát illetve az abból származó adatot 10 évre tárolják (biobankban helyezték el).
- Kizárólag orvostudományi célú – ezen belül is a pajzsmirigy betegségekkel összefüggő – kutatáshoz használhatják kódolt genetikai mintámat és klinikai adataimat.

- Tudomásul veszem, hogy beleegyezésemet bármikor visszavonhatom, ennek módjáról szóban és írásban tájékoztattak.
- A kutatásról szóban és írásban tájékoztatást kaptam, azt megértettem és tudomásul vettem.
- A beleegyező nyilatkozatból és a tájékoztatóból egy példányt a rendelkezésemre bocsátottak.

.....

DÁTUM: ____/____/____

ALÁÍRÁS

.....

Vizsgálatvezető aláírása